Estudios sobre la espermatogénesis del coleóptero *Phytodecta variabilis* (Ol.)

LOS CROMOSOMAS EN LA MITOSIS GONIAL Y EN LA REDUCCIÓN CROMOSÓMICA

POR

FERNANDO GALÁN

Museo Nacional de Ciencias Naturales (Madrid).

(Láms. III-VII)

SUMARIO

Páginas.

Introducción 461
Técnica 464
La mitosis gonial 467
La profase de conjugación 471
La interfase postsindética, el período diplotene y la primera división de maduración 478
La interquinesis y la segunda división de maduración 482
La espermiohistogénesis 484
El número de cromosomas y su identificación 486
Consideraciones finales 493
Zusammenfassung 494
Trabajos citados 498

Introducción.

El objeto principal del presente estudio es la comprobación citológica de la existencia de un par de heterocromosomas X Y en el macho del coleóptero crisomélido *Phytodecta variabilis* (Olivier), hipótesis inducida del estudio de la herencia ligada al sexo en este insecto por el Prof. Zulueta (1925), quien precisamente me propuso que efectuase aquella comprobación y al que, una vez más, por este motivo, me complazco en expresar aquí mi reconocimiento.

Emprendí la investigación en el testículo de la imago y, al tiempo que he conseguido demostrar por observación directa la existencia de

los heterocromosomas X e Y e identificar los 11 pares restantes de autosomas que completan la dotación cromosómica de *Phytodecta*, he efectuado el estudio de casi todo el proceso de la espermatogénesis y especialmente de la profase de conjugación, en la que he observado la parasíndesis de los cromosomas leptotenes y comprobado, mediante las mismas preparaciones fijadas, que la contracción sináptica es un artefacto muy probablemente vital.

Por consiguiente, trato de imprimir a este estudio, en la escasa medida que lo permiten mis posibilidades, estas dos notas que caracterizan a la Citología contemporánea: ser el auxiliar más positivo de la Genética y someter todas sus adquisiciones a una crítica rigurosa. Estas características están magistralmente reflejadas en el tratado fundamental de Bělař (1928 *a*), cuya terminología adopto preferentemente, sobre todo en lo que se refiere a la reducción cromosómica, que es objeto de uno de los capítulos más importantes y profundos, según Caullery (1928-1929), de dicho tratado.

Este espíritu crítico que anima a los citólogos actuales evidenciando *in vivo* o demostrando indirectamente la realidad vital, tanto de las adquisiciones recientes como de las pasadas, ha conseguido descartar la extremada suspicacia sustentada hasta en época no muy lejana (véanse si no en 1925 los trabajos de Schitz) por no pocos biólogos acerca de la naturalidad de las estructuras y fenómenos descritos por la Citología y de la validez de sus métodos. No obstante, permanecen aún planteadas, es claro, algunas cuestiones y sin suficiente comprobación muchos pormenores.

Así, por ejemplo, una de las cuestiones más discutidas y acerca de la cual no cabe dudar hoy, gracias a la labor de toda una legión de citólogos, es la conjugación de cromosomas homólogos (paterno y materno) que se realiza en el gonotoco de la mayoría de los metazoos y de las cormofitas y en algunos protistas; pero está todavía en pie el problema de la extensión y significación que debemos dar a los dos modos de conjugación (parasíndesis o conjugación *side by side* y metasíndesis o conjugación *end to end*) que se disputan la explicación de este proceso de tanta importancia para la Citología como para la Genética, pues el fenómeno de la reducción cromosómica constituye precisamente el nexo entre ambas ciencias. Desgraciadamente este fenómeno, además de sus dificultades intrínsecas, fáciles de comprender,

va unido, en la mayoría de las plantas y en muchos animales, a una contracción y apelotonamiento de los cromosomas (sinapsis o contracción sináptica) que dificulta y llega aún a hacer imposible todo análisis del proceso, y acerca de cuya interpretación como estructura natural, artefacto vital o artefacto de fijación, los citólogos están bastante lejos de la conformidad.

Pues bien, estas dos cuestiones precisamente, modo de conjugación y naturaleza e interpretación de la sinapsis, pueden analizarse bastante detenidamente en *Phytodecta* gracias a la frecuencia (trasunto de su duración) con que aparecen los estados correspondientes en el testículo de este insecto y a la relativa bondad que muestran ante una fijación apropiada. A su estudio he dedicado, por tanto, particular atención y constituye uno de los objetos principales de este trabajo.

En cuanto a la existencia del tipo X Y de heterocromosomas en *Phytodecta*, cuya comprobación constituye el otro objeto de estos estudios, resulta ya probabilísima desde 1925 por las investigaciones de Zulueta sobre la herencia de los distintos fenotipos de coloración de dicho crisomélido, que le habían llevado a admitir, para su explicación satisfactoria, que ciertos genes son transmitidos tanto por el cromosoma X como por el cromosoma Y, en el que hasta entonces no se habían localizado genes en *Drosophila* y cuya presencia, en cambio, no se consiguió demostrar en los dos pececillos ciprinodóntidos, *Aplocheilus latipes* y *Lebistes reticulatus*, en los que ya entonces se habían señalado, por Aida (1921) y Schmidt (1920), respectivamente, sendos casos de herencia que se explican, como el de *Phytodecta*, admitiendo que el supuesto cromosoma Y lleva genes.

Si las pruebas genéticas y citológicas aportadas por Stern en 1927 de localización de un gene alelomorfo de *bobbed* en el cromosoma Y de *Drosophila*, dejan fuera de duda que dicho cromosoma puede transmitir genes, en cambio, el que Winge, aunque localiza hasta nueve genes en el cromosoma Y de *Lebistes* y admite *crossing-over* entre X e Y para otros cinco [1] (1922*a*, 1923, 1927), no haya conseguido (1922*b*), como tampoco Vaupel (1929), demostrar claramente en dicho pececillo la existencia de cromosoma Y—aunque sí comprobar un número par diploide de cromosomas en ambos sexos—, acrecienta el

1 Todo lo cual lleva a Demerec (1927) a plantear algunas objeciones o las explicaciones de Winge.

interés de una exploración citológica en *Phytodecta*, que por cierto en *Aplocheilus* ni siquiera ha sido intentada hasta ahora, que yo sepa.

En cuanto a las plantas, Blackburn (1923), Winge (1923), Bělař (1925), Heitz (1925) y Breslawetz (1929), comprobaron la exacta verificación del tipo XY [un par de heterocromosomas desiguales (X e Y) en las células diploides masculinas y otro de heterocromosomas iguales (XX) al mayor de aquéllos en las femeninas] en *Melandrium*, donde el mismo Winge, primero en 1927 y últimamente en 1931, ha señalado, entre otros hechos, un caso de herencia por el cromosoma Y.

Todos estos antecedentes hacen casi seguro que *Phytodecta* pertenece también al tipo XY, máxime si, como ya hizo observar Zulueta (1925), se considera que éste es el caso en que se encuentran no sólo la mayoría de los coleópteros, sino precisamente seis de los siete crisomélidos estudiados hasta ahora (Stevens, 1909); no obstante, el especial interés de los fenómenos genéticos observados en aquel insecto reclama el conocimiento de su citología, cuyo estudio inicio con el presente trabajo.

Técnica.

He llevado a cabo estas investigaciones en el testículo de ejemplares de los fenotipos amarillo y rojo (Zulueta, 1925), pues, con ser escasos los demás y rarísimo en Madrid el de líneas [1], ninguna diferencia citológica cabe esperar al no tratarse aquí sino de una serie de múltiples alelomorfos (Zulueta, 1925).

En invierno, durante el cual estos crisomélidos desaparecen en el campo y se entierran en los cultivos que para su estudio mantiene el Prof. Zulueta, he utilizado ejemplares de estos mismos cultivos, procedentes directamente de los alrededores de Madrid o nacidos en el laboratorio de padres de este origen, y cuyas gonadas activaba colocándolos, desde varias horas a un día, en una estufa con ambiente húmedo a temperaturas de 19 a 23°. De este modo he conseguido sacar al testículo de *Phytodecta* de la latencia, nunca absoluta además, en que permanece durante el invierno.

En la primavera, en cuanto hace su aparición en el campo *Phyto-*

1 De manera que cuando afortunadamente se encuentran son valiosos para los experimentos de cruzamiento.

decta, y durante la primera mitad del verano, en que es abundante en los alrededores de Madrid, he acudido a ejemplares colectados en la Casa de Campo principalmente, y cuyos testículos fueron fijados dentro de las doce horas siguientes a su captura. Así, en lo que al objeto de este estudio se refiere, no he logrado advertir hasta ahora diferencia alguna entre el material fijado en invierno tomado de los cultivos del laboratorio y el traído del campo durante el verano y fijado a las pocas horas de su captura.

Para el estudio, recuento e identificación de los cromosomas metafásicos apliqué la fijación con San Felice o Nawaschin, y la coloración de cortes en parafina con violeta de genciana, técnica que análogamente emplean con preferencia, tanto el Dr. Stern, de Berlín, en sus investigaciones de citología genética, como el Prof. Dobzhansky, de Pasadena, para el estudio de las traslocaciones y de la topografía morfológica de los cromosomas de *Drosophila*.

A este efecto, la ablación de los testículos fué ejecutada, previa anestesia rápida del insecto con éter sulfúrico, en disolución de Ringer preparada en el acto. He fijado preferentemente con Nawaschin, seguido de una deshidratación muy gradual. Para la inclusión utilicé como medio intermediario el cloroformo purísimo y parafina de 56-58°. Así, con una estancia en el termostato a 60° durante ocho a diez minutos tan sólo, a través de cinco baños de parafina, he conseguido una inclusión perfecta de los testículos de *Phytodecta*. Después de algunos ensayos, terminé por adoptar los cortes de 7 μ como los más convenientes, dado el diámetro de los núcleos de las espermatogonias y la temperatura media (19°) a que eran practicados. Mi experiencia me ha enseñado que en *Phytodecta* no es preciso recurrir al método de Bizzozero para obtener una buena coloración de los cromosomas con violeta de genciana, basta el método de Gram. La transparencia de la coloración y la selectividad de este método permiten un análisis preciso y un estudio cómodo de los cromosomas. A este respecto, he comprobado que el filtro de verde de metilo recomendado por Orueta (1923, t. 1, pág. 420), que uso habitualmente, resulta muy apropiado para la observación de estas preparaciones teñidas con violeta de genciana.

En la investigación de la espermatogénesis, aunque también empleé el mismo fijador de Nawaschin y el Bouin-Allen, acudí preferentemente al Flemming, Flemming-Meves y, más especialmente, a una

prefijación (*Vorfixierung* Bělař, en Péterfi, 1928, t. I, págs. 654-656) con vapores de ácido ósmico y fijación inmediata con Flemming-Meves, pues los experimentos de Bělař (1928*b*), al evidenciar la fidelidad de las preparaciones obtenidas por este método y, en general, con los fijadores a base de ácido ósmico, los hace imprescindibles en la investigación citológica de todo fenómeno delicado cual la profase de conjugación.

Primeramente he intentado la prefijación en disociaciones de testículo; pero, bien debido a la resistencia que a una disociación oponen los cistos, o bien a mi impericia, no he conseguido por este camino preparaciones satisfactorias. Por el contrario, la prefijación durante uno a dos minutos sobre testículos enteros—lo que acorta las operaciones previas, siempre dificultosas en el interior de la cámara húmeda donde es preciso operar la ablación—y fijación en Flemming-Meves durante más de doce horas me ha proporcionado excelentes preparaciones de los estados más susceptibles de producir artefactos, a costa naturalmente de una fijación deficiente de todo lo que no sea la región periférica expuesta directamente a los vapores del tetróxido de osmio.

Las piezas así fijadas, para evitar toda retracción, las incluí en parafina según el método de Péterfi (Heringa, págs. 635-636, y Belař, página 652, en Péterfi, 1928, t. I; también Romeis, 1928, págs. 83-84); teniendo que recurrir a la esencia de clavo como disolvente de la celoidina, pues no pude disponer de benzoato de metilo. La penetración de la parafina, según pude comprobar, es por este método mucho más lenta, necesitándose no menos de una hora para obtener una buena inclusión; pero esta tardanza queda harto compensada con la mejor impregnación y retracción nula de los tejidos en general, que así se consigue. Los cortes han sido también en este caso de 7 μ de grosor.

Para la coloración utilicé en el estudio general de la espermatogénesis la clásica hematoxilina férrica de Heidenhain, preferentemente su método largo (doce horas en mordiente y veinticuatro en el colorante) y eventualmente el método rápido (media y una hora, respectivamente, en el termostato a 45°). El ennegrecimiento del protoplasma debido al osmio, muy acentuado después de una prefijación, que tanto dificulta la diferenciación de las preparaciones teñidas con la hematoxilina de Heidenhain, como después la observación y estudio de las mismas, terminé obviándolo manteniendo las preparaciones, antes de

someterlas al mordiente, en agua oxigenada diluída durante una hora aproximadamente, según recomienda Strasburger (Romeis, 1928).

Las observaciones han sido hechas con el objetivo Zeiss apocromático, 3 mm., n. A. 1,4, y el ocular compensador 18 de la misma marca. Con esta misma combinación óptica y el aparato de Abbe han sido obtenidos todos los dibujos.

La mitosis gonial.

(Lám. III.)

En el testículo de *Phytodecta* se encuentran las distintas fases de una mitosis representadas por espermatogonias de varios tamaños, comprendidos entre dos extremos bastante patentes. Las de tamaño más pequeño difieren algo de las demás en sus figuras telefásicas, a través de las cuales surgen los núcleos interfásicos del primer espermatocito. Esto nos indica que aquí se suceden inmediatamente repetidas divisiones, con progresivo decrecimiento, de las espermatogonias, hasta desembocar en el espermatocito.

Por este motivo, por dar origen inmediatamente al espermatocito, es la última mitosis gonial la que más nos interesa. En consecuencia, a ella concretamente se refiere la descripción siguiente, sin que pueda decir, por ahora, ni creo que sea cuestión de mayor importancia para el caso, cuántas generaciones de espermatogonias le preceden.

Interfase (lám. III, fig. *a*).—Las espermatogonias más pequeñas suelen tener un diámetro de 10 μ por término medio. Su contorno es más o menos redondeado, o ya poligonal. El citoplasma, que aparece claramente vacuolar, es bastante abundante. El núcleo en estado quiescente, como también en casi toda la profase, es casi esférico, ligeramente ovoideo, ocupando el centro de la célula.

En la interfase, el núcleo, al primer golpe de vista, muestra una estructura finamente granulosa y uniforme; pero observado más cuidadosamente, se nota que la cromatina no sólo se halla repartida en gránulos, sino también en cortos filamentitos, interpuestos unos y otros entre las vacuolas, y que algunos de aquellos granos están formados por otros dos más pequeños y muy juntos. Un grueso nucléolo, asentado generalmente en el centro del núcleo, acaba de caracterizar a las espermatogonias en su fase de descanso.

Profase (lám. III, figs. *b-e*).—Los primeros indicios de la profase se manifiestan por una condensación de la cromatina en numerosos filamentos cortos, rectos o curvos, que se orientan en todas direcciones por todo el núcleo. Observados atentamente estos filamentos, se ve que son dobles, es decir, que están hendidos a lo largo, siendo particularmente visible esto en ambos extremos (lám. III, fig. *b*). Este efecto último no sólo es debido, a mi parecer, a una mayor condensación de la cromatina en determinados puntos—los aparentes extremos—, sino también a que estamos en presencia de largos filamentos muy flexuosos, y cuyas flexuosidades han de quedar bien enfocadas en dos puntos de la curva y el resto de ella, cóncavo o convexo respecto al observador, permanece desenfocado. Apoya esta interpretación el que en los mismos núcleos aparezca también alguno que otro filamento más largo y de forma sinuosa (lám. III, fig. *b*); acabando por adoptar esta disposición toda la cromatina en estados más avanzados, en los cuales la constitución doble de dichos filamentos se muestra aún más patente (lám. III, fig. *c*). La división longitudinal del espirema o de los cromosomas es, como vemos, muy temprana.

En estos estados algo avanzados de la profase, se distinguen ya claramente los extremos libres de algunos filamentos (véase, por ejemplo, dos en el centro del núcleo y otro remontando el nucléolo en la fig. *c*, lám. III). No cabe, pues, duda de la discontinuidad del espirema, al menos en este estado. Si esta discontinuidad preexiste en estados más tempranos, nada puedo asegurar, y quizá sea imposible de dirimir esta cuestión directamente en este caso, como en otros muchos, porque son varias las causas que pueden motivar una continuidad aparente o real del espirema, como hace notar Bělař (1928 *a*). Sin embargo, tanto en opinión de este autor como en la de Wilson (1925), hechos positivos abogan indirectamente por la discontinuidad del espirema desde el principio, y a lo más, añade este último, la continuidad debe ser lo excepcional.

La marcha de la profase continúa con el engrosamiento del espirema y la reducción gradual de sus sinuosidades. Cada vez se hace más perceptible la hendidura longitudinal y más fácil seguir el curso de los cromosomas en toda su longitud, debido esto también a un acortamiento correlativo de los filamentos, evidente al final de la profase (compárense las figs. *e* y *f*, lám. III). Y llega así el momento en que

los cromosomas adquieren la forma característica que presentan en la metafase [nótese en el centro de la figura *f* de la lámina III el cromosoma B (véase más adelante, pág. 492 y lám. VII)].

Algo antes de estos momentos hace su aparición en el citoplasma, cerca del núcleo, el aparato acromático, compuesto de dos centríolos y sendas zonas minúsculas más obscuras que el citoplasma circundante, de forma cónica muy abierta, con los vértices en los centríolos y situadas entre los mismos, pero no hay nada de huso central que una ambos centrosomas (lám. III, fig. *e*). Después los centríolos se separan, la membrana nuclear desaparece y el aparato acromático, que paralelamente se ha desarrollado, invade la región nuclear. De esta manera se verifica el tránsito a la metafase, durante el cual la hendidura longitudinal de los cromosomas, que entonces se encuentran en el máximum de condensación, se hace menos perceptible y aun llega a borrarse completamente en algunos casos (lám. III, fig. *f*).

METAFASE (lám. III, fig. *g*).—Contemplando esta figura, que representa el enfoque medio de una espermatogonia en metafase, se advierten los rasgos característicos de la mitosis que nos ocupa.

Los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial de la figura acromática ocupándolo en toda su extensión (como puede apreciarse mejor en las figuras de la lám. VII), es decir, la placa ecuatorial no está formada por cromosomas dispuestos en anillo, sino repartidos en un área circular.

No hay, por consiguiente, huso central (*central-spindle*, Wilson, 1925; *Zentralspindel*, Bělař, 1928 *a*), como ya se comprueba al nacimiento del aparato acromático, sino tan sólo fibras, o más bien manojos de fibras, que van de los centrosomas a los cromosomas y cuyo conjunto adopta también figura fusiforme, siendo denominado *half-spindle* por los autores ingleses (Wilson, 1925) y *Halbspindeln* por los autores alemanes. Bělař (1928 *a*) propone para esta parte del aparato acromático el nombre de *Spindelpolteile*, y, más recientemente (1929), el mismo autor sostiene la opinión de que estas fibras, cuya realidad vital comprueba al mismo tiempo, se forman a expensas de los centrosomas, justificando así el nombre propuesto.

Pero aquí, en *Phytodecta*, la sobriedad del aparato acromático va más allá; faltan también las radiaciones polares o ásteres, aun cuando los centrosomas son bien manifiestos (véanse figs. *e-h*, lám. III).

Vemos, por tanto, que el aparato acromático está reducido en la mitosis gonial de nuestro crisomélido a casi su mínima expresión, pues las fibras del huso que aquí se ven constituyen el elemento fundamental de la figura acromática en la metafase, constante en toda mitosis, y que los autores homologan, sin más, con las fibras superficiales (*mantle-fibers* de los ingleses, *Mantelfasern* de los alemanes) de las mitosis con huso central; y en cuanto a los centrosomas, su ausencia en los metazoos sólo se comprueba raramente [1].

Las espermatogonias permanecen en plena metafase bastante tiempo, a juzgar por la relativa frecuencia con que se presentan en este estado.

Anafase (lám. III, fig. *h*).—Este período, en cambio, debe de transcurrir rapidísimo, sobre todo al principio, por lo cual no he podido estudiarlo tan detenidamente como quisiera. Al final de la anafase aparecen ambos grupos de cromosomas hijos apiñados en su camino hacia los centrosomas respectivos y, sobresaliendo del lado ecuatorial de cada uno de aquellos grupos, sendos cromosomas larguísimos, que se corresponden en el mismo meridiano de la figura acromática. Es ésta una disposición absolutamente constante al final de la anafase de la última mitosis gonial. Este cromosoma no puede ser otro, precisamente por su gran longitud, que el cromosoma X (véase más adelante, pág. 491 y lám. VII).

Entre cada grupo de cromosomas hijos y su respectivo centrosoma se ve la parte correspondiente del huso polar (*Spindelpolteile* de Bělař), y entre ambos grupos de cromosomas hijos aparecen ahora unas fibras más gruesas, más separadas, que no están dispuestas en hacecillos (compárense las figs. *g* y *h*, lám. III) y que parecen ir de los cromosomas de un grupo hijo a los del otro (*connecting-fibers* o *interzonal fibers*, de los autores ingleses y americanos, y *Verbindungsfasern*, de los alemanes). Estamos en presencia de un aparato distinto, cuyo papel causal en la emigración anafásica de los cromosomas hijos ha sido puesto en relieve por Bělař estudiando la división de los espermatocitos de *Stenobothrus* en el jugo celular y en medios hipotónicos e hipertónicos y al que designa dicho autor con el nombre de *Stemmkörper*. Nótese en la figura *h*, lámina III, cómo culmina el desarrollo de este *cuerpo propulsor* al final de la anafase.

1 En las divisiones de maduración de ciertos artrópodos y gusanos.

En la misma figura se asiste al principio del engrosamiento de las fibras de dicho aparato a su paso por el plano ecuatorial, iniciándose así la formación de una placa intercelular o diastema, que contribuirá probablemente a la división del citoplasma.

TELEFASE (lám. III, figs. *i-k*).—Los cromosomas, al final de su camino en los polos de la figura acromática, experimentan un movimiento que los dispone más horizontalmente. Poco después se inicia en ellos una vacuolización progresiva (lám. III, figs. *i*, *j*) que conduce paulatinamente a la formación del núcleo quiescente del primer espermatocito. Mis preparaciones no son hasta ahora lo suficientemente abundantes en estos estados para permitirme, como en la profase, un análisis completo del proceso telefásico, tan parecido a ésta, y que lleva inherentes las mismas dificultades de observación y formación de artefactos. Queda, pues, por resolver si aquí se trata de verdaderos procromosomas, como parece.

Al principio de la telefase, los centrosomas desaparecen y el cuerpo propulsor inicia su involución. Paralelamente, los engrosamientos diastemáticos de sus fibras se condensan progresivamente, aproximándose entre sí por la acción combinada de estos procesos y de la estrangulación anular del citoplasma, que de esta manera termina por individualizar las dos células hijas (lám. III, fig. *k*).

La mitosis de las espermatogonias de *Phytodecta* se caracteriza en resumen por la laxitud del espirema, del cual surgen los cromosomas dejando amplios espacios de carioplasma libre (lám. III, fig. *c*) por la división longitudinal de los cromosomas tempranísima (lám. III, fig. *b*), por la ausencia de huso central (lám. III, figs. *e* y *f*) y de radiaciones polares (lám. III, figs. *e-i*), por la presencia de centrosomas (lám. III, figuras *e* e *i*) y por la formación inicial de un diastema (lám. III, figs. *h k*).

La profase de conjugación.

(Lám. IV, figs. *a-k*, y lám. VI).

Las dificultades de interpretación y la formación de artefactos, inherentes al estudio de toda profase, se acentúan en extremo durante la profase de conjugación, que ha sido uno de los puntos más discutidos de la Citología, pues en él no sólo se ventilaban intereses puramente citológicos, sino también genéticos.

Actualmente, el interés de los citólogos está en comprobar si, como parece, la parasíndesis o conjugación paralela de los cromosomas, evidenciada por varios autores (Wenrich, McClung, Janssens, Gelei, Keunecke y otros [1]) en organismos de distintos grupos y acerca de la cual existen indicios en otros muchos, representa el modo general de conjugación (Bělař, 1928*a*).

Esta manera de ver la cuestión del modo de conjugación gana cada vez más terreno en la opinión general de los citólogos a medida que se va comprobando su generalidad.

Es, pues, el modo de conjugación en *Phytodecta* lo que importa esclarecer especialmente al estudiar la reducción cromosómica de este insecto.

Otro punto que merece actualmente la especial atención del citólogo en estos estudios es la interpretación de la *Synapsis* (autores alemanes) o *synizesis* (autores ingleses); es decir, de la contracción y apelotonamiento que experimentan los cromosomas durante la conjugación, después de ella y, según demuestra el interesante caso citado por Nonídez (1914, 1915 y 1920), antes de la misma, cuando todavía están en estado de procromosomas. Este fenómeno se creyó, al principio, debido a la fijación; más tarde, muchos citólogos, fundándose en la presencia de la sinapsis en células vivas, admitieron que era un proceso normal en la profase de conjugación; pero actualmente, como señala Bělař (1928*a*), al comprobarse la producción de artefactos vitales y considerar las condiciones en que eran observadas *in vivo* esas células, aquellos argumentos pierden toda su fuerza demostrativa. Por el contrario, este autor, después de sus cuidadosas observaciones en los espermatocitos de *Stenobothrus* y en las células madres del polen de *Convallaria majalis,* sustenta la opinión de que la sinapsis es, en general, un artefacto vital y algunas veces de fijación o, al menos, intensificado por ella.

Lenoir (1927) afirma recientemente todavía que, después de sus

[1] A este respecto merece especial mención el citólogo español Bordás, quien, después de haber investigado estas cuestiones en *Sagitta* (1912, 1914, 1920), emprendió sus estudios en *Dendrocoeleum* (1921, 1922), demostrando en la espermatogénesis de este turbelario la parasíndesis, casi al mismo tiempo que Gelei (1921) la observaba en la ovogénesis de la misma especie y aportaba una de las pruebas ya clásicas de la conjugación paralela.

observaciones *in vivo* en las anteras de *Lilium candidum*, no cabe duda de la contracción sináptica, conceptuada por muchos autores como artificial. Pero su trabajo, sin exposición de la técnica empleada, sin descripciones más precisas de sus observaciones y, en fin, sin decir claramente si lo que ha observado son los distintos momentos de la reducción cromosómica en diferentes células o, como ya ha argumentado Bělař para otros casos, todo el proceso en una misma célula viva, no puede, a lo más, ser tenido en cuenta a este respecto.

Tocante a esta cuestión, en *Phytodecta* he podido completar, mediante las mismas preparaciones fijadas, el estudio de la profase de conjugación con el del proceso sináptico que aquí ocurre.

La interfase presindética (lám. IV, fig. *a*).—El espermatocito se caracteriza en la interfase por el tamaño pequeño (7 μ de diámetro a lo más), el contorno más o menos poligonal y el núcleo grande y excéntrico. Esta excentricidad ocasiona que el citoplasma quede en algún sitio, reducido a una película adosada al núcleo. El centrosoma no he conseguido distinguirlo en este estado, ni tampoco durante la profase.

En el núcleo, casi siempre esférico, la cromatina aparece repartida en gránulos y en alguno que otro grumo de mayor tamaño, interpuestos entre las vacuolas. Se distinguen también dentro del núcleo dos corpúsculos, uno de los cuales está generalmente algo menos coloreado y es de contorno más regular que el otro (lám. IV, figs. *a*, *b*; en la primera sólo está enfocado este último y en la segunda ambos). Como veremos más adelante (pág. 479), el primero es un genuino nucléolo y el segundo un cariosoma, que se identifica probablemente con los heterocromosomas.

El espermatocito debe permanecer algún tiempo, aunque no mucho, en este estado de interfase.

Los estados de «bouquet» (lám. IV, figs. *c-i*).—La profase se inicia disponiéndose la cromatina en numerosos y finísimos filamentos que discurren por todo el núcleo y en los que, a medida que van engrosando, se puede comprobar que forman realmente otros más largos, arrollados como tirabuzones. En seguida se advierte que estos filamentos presentan una orientacion general hacia determinado sitio de la periferia nuclear (lám. IV, fig. *b*): es la conocida orientación polar de los cromosomas que acaece en la profase de muchas divisiones y

que se hace particularmente manifiesta, ocasionando los típicos estados de *bouquet*, durante la profase de conjugación (a la que entonces caracteriza), en la mayoría de los animales, en muchas plantas y en algunos protistas.

Dichos filamentos van deshaciendo sus ondulaciones y haciéndose cada vez más vivibles, debido, como ya se ha indicado por los autores en otros casos, a una indudable condensación de la cromatina con el correlativo acortamiento de los filamentos, en los que entonces se hace más patente aun la mencionada orientación polar y se comprueba la existencia de extremos libres (lám. IV, figs. *c-d*); es decir, que aquí, como en la profase gonial, no cabe hablar de continuidad del espirema y sí de distintos cromosomas leptotenes.

Desde estos momentos el cariosoma adopta el aspecto característico que ofrece durante toda la profase: se le ve constituído por varias masas esféricas, casi constantemente cinco, agrupadas de distinto modo según los casos (lám. IV, figs. *d* y siguientes).

Estudiando detenidamente el estado leptotene, se comprueba que desde los primeros momentos, entre los filamentos finos apenas estirados, surgen otros manifiestamente más gruesos y se puede observar, en algunos de éstos, que están formados por dos filamentos finísimos adosados estrechamente a lo largo; siendo sobre todo evidente esta duplicidad cuando se enfoca a través alguno de los engrosamientos granulares que aparecen esparcidos en dichos filamentos gruesos (lámina IV, fig. *d;* véase el filamento que aparece en primer término al medio del núcleo). En casos más favorables aun se comprueban otros dos detalles importantísimos: los filamentos finos que juntos integran los más gruesos se separan en algunos de éstos, ya para perderse en el interior del núcleo (lám. IV, fig. *c*), o para confluir nuevamente durante otra parte de su curso (lám. IV, fig. *d*; véase el filamento de la izquierda en la porción horizontal de su trayecto). He observado varios casos parecidos y de ellos he escogido los dos que represento en las figuras acabadas de mencionar, después de convencerme de la realidad de esa disposicion.

En estados sucesivos, como lo indica el progresivo y gradual crecimiento del espermatocito, no se ven más que filamentos gruesos, cuya duplicidad de constitución todavía se trasluce en algún punto (lám. IV, fig. *e*). De esta manera se establece completamente el estado paquitene.

Considerando ahora la marcha general de este proceso, no cabe duda que, en el paso de los filamentos leptotenes a los paquitenes, lo que ocurre no es una escisión de los primeros en los dos componentes que se observan luego en los segundos, como pretenden los partidarios de la metasíndesis o conjugación *end to end*, sino la reunión en toda su longitud de cada dos filamentos leptotenes en uno paquitene; en una palabra, la conjugación paralela o parasíndesis de los cromosomas.

Nótese que, como digo más arriba, apenas desarrollados los filamentos leptotenes, aparecen ya algunos paquitenes, siendo así imposible delimitar aquí ambos estados como se ha hecho en otros casos, que siempre presentan, claro es, un tránsito gradual. Por esa razón los he englobado bajo el epígrafe de estados de *bouquet*.

El período paquitene dura mucho tiempo, pues los espermatocitos en estos estados son abundantísimos en todos los testículos. Durante él, el espermatocito crece continuamente hasta alcanzar un diámetro más de vez y media el primitivo. Paralelamente los filamentos paquitenes continúan engrosando, acortando su longitud y disociándose sus dos componentes en dos filas paralelas y simétricas de gránulos esparcidos desigualmente a lo largo del filamento (lám. IV, figuras *e-h*, y lám. VI, figs. *a-d*). En estas condiciones favorables puede contarse en el núcleo de bastantes espermatocitos el número haploide de filamentos paquitenes (véase más adelante, págs. 487-488), concordando con la conjugación anteriormente demostrada, que nos permite interpretar esos filamentos paquitenes como verdaderos *gemini* parasindéticos.

Observada con más cuidado la estructura granular de los *gemini*, compruébase (véase lám. IV, figs. *d-h*, y lám. VI) que las condensaciones más abundantes son en realidad granulares o puntiformes, pero también, menos frecuentemente, alargadas; que, tanto en unas como en otras, las situadas en el filamento a la misma altura, correspondiéndose frente a frente, son iguales; y finalmente, que estos distintos pares de condensaciones no están repartidos con uniformidad a lo largo del *geminus*.

Ahora bien: aun en el caso de que esta estructura fuese producida o condicionada por la fijación, no puede por menos de admitirse, ante la simetría que presenta en los dos componentes de todos los *gemini*,

que responde a una disposición preformada de los elementos del cromosoma vivo, siendo en un todo semejante a la encontrada, entre otros casos, por Wenrich (1916) en *Phrynotettix magnus*, donde el mismo autor consiguió comprobar la constancia absoluta de dicha estructura para un mismo *geminus* en los espermatocitos de trece individuos distintos de dicho ortóptero. Pero es más; recientemente Bělař (1928 *b*) demostró, en los espermatocitos de *Stenobothrus*, que la disposición de los cromómeros en el cromosoma era la misma en las preparaciones obtenidas por prefijación con ácido ósmico y fijadas con Flemming que en el material vivo, advirtiéndose solamente una ligera contracción general de todo el cromosoma.

No cabe, pues, duda al tomar los gránulos del *geminus* que se ven en nuestras preparaciones hechas por esos métodos, como los elementos verdaderos de la estructura vital del cromosoma; es decir, como fiel imagen de los cromómeros naturales.

Antes de pasar más adelante, creo que es aquí el lugar más oportuno de examinar la cuestión de la interpretación de la sinapsis [1] en *Phytodecta*.

En mis preparaciones aparecen, en todos los estados, desde el leptotene hasta el final del paquitene, espermatocitos con sus cromosomas en contracción sináptica más o menos acentuada y otros exentos de ella. De tal modo, que pueden formarse dos series graduales a través de la profase de conjugación, tan distintas como la que se ve en la lámina IV, figuras *d-h*, y la que se formaría con las figuras *a-d* de la lámina VI, de las que en la primera los cromosomas siguen su evolución sin sinapsis, y en la segunda, con una indudable y típica contracción sináptica. Pero, a partir del final del período paquitene, cuando los cromosomas comienzan a perder colorabilidad (véase más adelante, pág. 478), sin dejar de ser claramente perceptibles (lám. IV, figuras *j-k*), no he observado nunca sinapsis.

Es indudable que estos dos procesos no pueden acaecer simultáneamente. Y si consideramos la falta de continuidad insuperable en-

1 El término sinapsis lo empleo aquí en la acepción de los autores alemanes para expresar la contracción y apelotonamiento de los cromosomas durante la conjugación y después de ella (Bělař, 1928 *a*, pág. 169); es decir, como sinónimo de *synizesis* de los autores de lengua inglesa (Wilson, 1925, pág. 541).

tre el segundo y el principio del paso a la interfase postsindética, hemos de admitir el otro, exento de sinapsis, como el natural.

Continuando el estudio de las preparaciones fijadas, se puede analizar todavía más completamente este fenómeno. Compruébase así con los distintos fijadores que la sinapsis en determinados estados es más frecuente y, en general, más intensa que en otros; frecuentísima en el estado leptotene al verificarse la conjugación e inmediatamente después de ésta, decrece gradualmente su frecuencia e intensidad a medida que avanza el estado paquitene y se anula bruscamente al iniciarse el paso a la interfase postsindética. Bien entendido que, aunque la intensidad del fenómeno decrezca durante el período paquitene, siempre se puede encontrar de un estado determinado, más o menos espermatocitos con sinapsis grande; por ejemplo: el espermatocito de la figura *d,* lámina VI, y el que representan en dos sucesivos enfoques las figuras *g, h,* lámina IV, que son de la misma edad—como lo demuestra su tamaño, el grosor y aspecto de los *gemini,* y el hecho de yacer próximos en el mismo cisto—, corresponden precisamente al momento más rebelde a la sinapsis y, sin embargo, el primero presenta una intensa contracción sináptica, de la que no existen indicios en el segundo. Esto nos demuestra que el núcleo del espermatocito posee una labilidad para experimentar la contracción sináptica mayor en unos estados que en otros, conforme a las líneas generales acabadas de indicar.

Que la sinapsis no es una coagulación producida por los fijadores, como se pensó al principio (Meves, Janssens, McClung, Schreiner y otros), lo demuestra el hecho evidente de su observación *in vivo,* o mejor dicho, en material fresco no fijado por distintos citólogos (Sargent, Overton, Grégoire, Vejdovsky, Œttinger, Wilson, etc.) (Wilson, 1925). En consecuencia, muchos de estos autores admiten sin reservas que la sinapsis es un proceso normal de la célula durante la conjugación; pero Bělař ha hecho notar que esto no probaría más que dicho fenómeno es anterior a la fijación, pues lo que en realidad se ha observado no es la sucesión de la sinapsis en una célula viva, sino células frescas y no fijadas que presentaban contracción sináptica. Es más, este último citólogo ha demostrado cómo una solución débilmente acidulada con ácido acético provoca en los espermatocitos de *Stenobothrus,* sin llegar a la coagulación, una contracción sináptica

típica (que en este caso falta, por cierto, en una fijación buena), traducida luego fidelísimamente por una fijación irreprochable; y que en las células madres del polen de *Convallaria*, observadas cuidadosamente vivas, no se presenta la sinapsis que de otro modo se produce tanto en una pretendida observación *in vivo*, si no se tienen esas precauciones, como, en todo caso, en las preparaciones fijadas. Fundándose en estas observaciones y experimentos, sostiene el mencionado citólogo que la sinapsis es un artefacto vital.

Nuestras observaciones en *Phytodecta* acerca de este punto concuerdan, por tanto, con esta interpretación, al demostrar, como hemos visto, que la sinapsis no es un fenómeno normal de la célula y que depende estrechamente de un estado de labilidad peculiar a la misma en determinados momentos de su evolución.

La interfase postsindética, el período diplotene y la primera división de maduración.

(Lám. IV, figs. *j-s*)

La interfase postsindética (*diffuse stage* o *confused stage* de los autores de lengua inglesa) (lám IV, figs. *j-l*).—Este período, caracterizado por una disociación y pérdida de colorabilidad progresivas de los autosomas, que sigue al estado paquitene en la espermatogénesis y, más frecuentemente, en la ovogénesis de muchos animales, permite comprobar la existencia de heterocromosomas o cromosomas sexuales por la heteropicnosis de su cromatina, que no experimenta ese proceso, sino que, al contrario, más bien parece acrecentar su avidez para los colorantes.

Este fenómeno, cuya intensidad varía en los diferentes casos observados, es muy marcado y duradero en los espermatocitos de *Phytodecta*, como ahora veremos.

El espermatocito alcanza ya su mayor tamaño en el período paquitene (lám. IV, figs. *g-i*). Desde este momento en adelante se advierte cómo disminuye paulatinamente la colorabilidad de la cromatina y cómo se acentúa la separación de los dos cromosomas en cada *geminus* (lám. IV, figs. *j-k*). Al principio de este proceso todavía pueden seguirse durante todo su curso los cromosomas, delicadamente esfuma-

dos (lám. IV, fig. *j*); pero más tarde esta comprobación va siendo cada vez más difícil, y aun así, sólo en trayectos más o menos cortos. Entonces la separación de los dos componentes de cada *geminus* toca al máximo que llega a alcanzar antes de la interfase postsindética propiamente dicha (lám. IV, fig. *k*). La prosecución de estos procesos arrastra al núcleo del espermatocito a un estado muy semejante al de interfase, subsistiendo inalterables sólo los dos corpúsculos nucleolares cuya presencia venimos comprobando desde el principio de la profase de conjugación (lám. IV, fig. *l*).

Mirando las figuras *d-l*, lámina IV, y las *a-d*, lámina VI, se adquiere el convencimiento de que estos dos corpúsculos son dos formaciones bien diferentes y caracterizadas: la una es más o menos esférica u ovoidea, raramente de contorno irregular (lám. IV, fig. *h*), a veces típicamente piriforme (lám. IV, fig. *e*), con bastante inconstancia para la coloración con hematoxilina férrica, pues en no pocos casos resulta menos intensamente teñida, mostrando entonces que se halla exenta de estructura figurada (lám. IV, figs. *b, e, f, p*); la otra formación, siempre intensamente teñida, aparece formada constantemente por cuatro o cinco masas globulares, de las cuales algunas son más pequeñas que las otras (lám. IV, figs. *d, e, g, j*), haciéndose más patentes en la interfase postsindética precisamente (lám. IV, figs. *k, l*). A mi parecer, la primera se identifica fácilmente con un nucléolo verdadero, y la segunda como un cariosoma dotado de evidente heteropicnosis, esto es, como uno o varios heterocromosomas o cromosomas sexuales. Estas diferencias se comprueban mejor aún con el violeta de genciana, que tiñe débilmente al nucléolo (lám. VI, fig. *e*; compruébese en esta figura la forma típica que presenta en lám. IV, fig. *e*) e intensamente al heterocromosoma (lám. VI, figs. *f-h*).

Período diplotene (lám. IV, figs. *m-p*).—En la interfase postsindética los granos de cromatina parecen disponerse a lo largo de filamentos apenas perceptibles, observándose en algunos puntos que son en realidad dos granos y no uno lo que allí existe (lám. IV, fig. *l*). Hago notar esto porque parecen ser los indicios de lo que a continuación sucede.

Al cabo de algún tiempo se inicia la salida de la interfase, surgiendo en el núcleo del espermatocito largos filamentos que pronto dejan ver que se hallan reunidos por pares, pero tocándose apenas más que

por sus extremos, lo que origina que alguno de estos complejos adopte forma anular (lám. IV, fig. *m*) y que otros aparezcan con nodos y vientres, remedando una cadena (lám. IV, figs. *m-n*), o la cifra 8 (lámina IV, fig. *o*) cuando son más cortos. Pero es que estos cromosomas conjugados, además de permanecer en contacto en unos puntos y separados en otros, presentan frecuentemente una torsión mayor o menor, que se vislumbra en el de la figura *m*, se halla iniciada en el de la figura *n* y aparece indudable en el de la figura *o*. Se asiste, por tanto, aquí a un verdadero estado estrepsitene.

Durante los primeros momentos de estos *gemini* estrepsitenes se observa una hendidura longitudinal en cada uno de sus dos cromosomas componentes (lám. IV, fig. *m*). Reparemos en que, por tanto, coexisten bien manifiestas al principio del estado estrepsitene las dos hendiduras según las cuales se dividirá la tétrada en las divisiones de maduración que pronto tendrán lugar: la hendidura ecuacional, que es la que presentan cada uno de los filamentos componentes del *geminus* estrepsitene; y la reduccional, que no es sino la separación que media entre ambos componentes.

Tanto el nucléolo como el heterocromosoma se siguen distinguiendo durante el estado estrepsitene (véase el primero en la lámina IV, figs. *m-o*, y el segundo en la fig *o*, por debajo del cromosoma en 8).

La evolución de los cromosomas estrepsitenes continúa con el acortamiento y engrosamiento generales a toda profase, que principian borrando la hendidura longitudinal (ecuacional) de cada uno de los conjugados y disminuyendo progresivamente la separación (hendidura reduccional) que existe entre los mismos (lám. IV, figs. *m-o*).

El período estrepsitene finaliza con la máxima contracción de los *gemini*, en los que acaba por reducirse la separación de sus dos cromosomas conjugados a una ligera hendidura, completamente borrada en algunos, aunque siempre se distinguen claramente los dos componentes. De esta manera se establece el brevísimo estado que precede inmediatamente a la primera división de maduración conocido con el nombre de diaquinesis (lám. IV, fig. *p*).

Desde el final del período paquitene y durante todo el período diplotene se asiste a la aparición del condrioma del espermatocito en forma de una zona esférica u ovoidea, de aspecto homogéneo (lám. IV,

figs. *k*, *m*), que termina su desarrollo en la diaquinesis, mostrando entonces una delicada estructura fibrilar (lám. IV, fig. *p*).

La primera división de maduración (lám. IV, figs. *q-s*).—Comparando la figura *p* con las *q-r*, lámina IV, que representan dos enfoques sucesivos de la misma célula, se comprueba cómo los cromosomas de la diaquinesis pasan sin modificación alguna a formar la placa ecuatorial de la primera división de maduración.

En las mismas figuras (lám. IV, figs. *q*, *r*) y valiéndose de los esquemas respectivos (fig. del texto 2: *A*, *B*), se ve cómo los *gemini* 1 a 7 se dividen reduccionalmente, pues ya hemos comprobado que durante el período estrepsitene se borra la hendidura ecuacional y queda al fin en la diaquinesis sólo la reduccional, más o menos perceptible. Respecto a los restantes *gemini*, no es tan fácil de comprobar, a causa de la estrangulación que cada uno de sus componentes presenta (lám. IV, fig. *p*), si se dividen ahora reduccionalmente o ecuacionalmente, pues es sabido que en multitud de casos se ha comprobado que ambas divisiones de maduración pueden ser reduccionales para unas tetradas y ecuacionales para las otras [1].

En la figura *q*, lámina IV, se observa también una pareja de heterocromosomas que se separan precozmente, marchando hacia un polo el cromosoma X, más grande y casi recto, y hacia el otro, el cromosoma Y, más pequeño y casi esférico. Hemos, pues, de admitir que estos cromosomas sexuales X e Y estaban conjugados en el único y complejo cariosoma que se observa durante toda la profase de conjugación y estados siguientes, para dividirse reduccionalmente en la primera división de maduración.

Aparte del mayor tamaño de la célula y del aspecto de los cromosomas, caracteriza en seguida a la primera división de maduración unas radiaciones polares, que ofrecen la particularidad de ser muy perceptibles al primer golpe de vista, sobre todo cuando se observan con un ocular de poco aumento, sin que se logre después resolver la menor estructura filamentosa al tratar de estudiarlas más detenidamente con un ocular de mayor aumento (ocul. compen. 18 de Zeiss y, claro

1 Una exposición detallada y un resumen y balance del estado de esta cuestión puede leerse en Carothers (1926). Recientemente han señalado distintos casos de pre-reducción y post-reducción Chickerin (1927), Goldschmidt y Katsuki (1928), y McClung (1928).

es, un objetivo apocromático, el n. A. 1,4 de Zeiss). Pero, en estas condiciones se comprueba, en cambio, una ordenada disposición radial de vacuolas más claras a partir de los centrosomas, que es indudablemente lo que a primera vista produce la ilusión óptica de una estructura filamentosa (lám. IV, figs. *q-s*). Por lo demás, la primera división de maduración coincide con la mitosis gonial en la presencia de centrosomas, en la ausencia de huso central y en la disposición en hacecillos de las fibras del huso polar (*halb spindle* de los autores ingleses, *Spindelpolteile* de Bělař).

Los cromosomas anafásicos de la primera división de maduración aparecen divididos longitudinalmente por una hendidura, y algunos de ellos, además, con sus mitades separadas parcialmente en los extremos (lám. IV, fig. *s*). Esta división de los cromosomas anafásicos es característica de la primera división de maduración, y no es debida sino a la reaparición de la hendidura—en este caso, como ya hemos visto, la ecuacional probablemente—que ha sido más o menos borrada por la contracción que tiene lugar durante el final del período diplotene hasta la diaquinesis.

La telefase de esta división y, por consiguiente, la evolución de las diadas hasta la interquinesis, no he conseguido sorprenderlas. Pero podemos suponer que las diadas no deben de experimentar cambios importantes, porque aparecen condensadas en el núcleo del segundo espermatocito, sin que éste adopte estructura típicamente interfásica.

La interquinesis y la segunda división de maduración.

(Lám. V, figs. *a-d*).

La interquinesis (lám. V, fig. *a*).—La interquinesis adopta aspecpectos muy variables en los distintos casos observados; desde una típica interfase hasta la persistencia de las diadas condensadas, que pasan directamente sin más transformación de la anafase de la primera división de maduración a la metafase de la segunda, se conocen toda una serie gradual de tipos intermedios que se dan en distintos animales y plantas.

La interquinesis de *Phytodecta* pertenece a este último tipo extremo, como ahora veremos.

El segundo espermatocito, de forma esférica o ligeramente poliédrica, tiene corrientemente un diámetro de 9 μ. El citoplasma es bastante más abundante que en el primer espermatocito, y el núcleo es esférico (lám. V, fig. *a*).

El núcleo no presenta nunca una típica estructura interfásica, sino que en él se ven cromosomas en un estado de condensación semejante al de una metafase. Estos cromosomas aparecen con una hendidura longitudinal, y algunos de ellos, formados de dos trozos iguales cruzados (lám. V, fig. *a*). Son, pues, las diadas separadas en la primera división de maduración. En algunos núcleos se advierte un cromosoma más o menos piriforme y manifiestamente más grande que todos los demás. Este cromosoma es indudablemente el heterocromosoma X. El hecho de que no aparezca en todos los espermatocitos está de acuerdo con lo que hemos comprobado en la primera división de maduración, que separa los cromosomas X e Y hacia uno y otro polo (es decir, que el *geminus* de heterocromosomas se divide reduccionalmente en la primera división), de modo que la mitad de los segundos espermatocitos habrán recibido el cromosoma X, y la otra mitad, el cromosoma Y. Ahora bien, en los espermatocitos sin el grueso cromosoma, no me fué posible reconocer el heterocromosoma Y; lo que es explicable por su tamaño, que lo hace, en estos estados en que todos se hallan condensados, confundible fácilmente con otros varios.

La segunda división de maduración (lám. V, figs. *b-d*).—En las placas ecuatoriales de la segunda división de maduración puede hacerse la misma comprobación: en unas aparece un cromosoma más grueso y también algo más largo que los demás (lám. V, ángulo superior derecho de la fig. *b*) y en otras falta tal cromosoma (lám. V, fig. *c*).

Las mismas figuras *b*, *c* de la lámina V, nos enseñan que tampoco la segunda división de maduración posee huso central. En la figura *d*, lámina V, se observa la presencia de centrosomas, y nuevamente, la ausencia de las radiaciones polares o ásteres, igual que en la mitosis gonial. Las fibras de los husos polares siguen estando dispuestas en hacecillos, como ya hemos observado en la mitosis y en la primera división de maduración.

El proceso ulterior de la segunda división de maduración no he podido estudiarlo en el material examinado hasta ahora, y constituye con el período correspondiente de la primera división las dos solu-

luciones de continuidad, bien es verdad que de importancia secundaria, que existen en el presente estudio de la reducción cromosómica de *Phytodecta;* y que me propongo completar, junto con el estudio de otros puntos y cuestiones que estas previas exploraciones me suscitan, en futuras investigaciones.

Y ahora veamos cuáles son las características de la reducción cromosómica en la espermatogénesis de *Phytodecta*. En primer lugar están, sin duda, la conjugación parasindética y la presencia de heterocromosomas X e Y, que se conjugan en un cariosoma heteropicnótico. En segundo lugar, su profase de conjugación está caracterizada por típicos estados de *bouquet*, y el período diplotene en su más amplia acepción, por una interfase postsindética marcadísima seguida de un verdadero estado estrepsitene. Finalmente, la primera división de maduración es reduccional, desde luego para los heterocromosomas y, probablemente también, para la mayoría de los autosomas.

La espermiohistogénesis.

(Lám. V, figs. *e-o*).

El examen del testículo me ha deparado, en cambio, sin salirme apenas de mis especiales pesquisas, la observación de todo el proceso mediante el cual la espermátida resultante de la segunda división de maduración se transforma en el espermatozoide maduro; y, juzgando que es aquí, sin duda, lugar más o menos oportuno para las breves palabras que le dedicaré, decidí incluir la descripción de la espermiohistogénesis al final del estudio de la reducción cromosómica, aunque se salga un tanto de los fines más especiales que me propuse en este trabajo.

Las espermátidas jóvenes son ligeramente ovoideas e incluso esféricas (lám. V, fig. *e*), con un diámetro de 7 μ por término medio. El núcleo de las espermátidas, de tamaño regular y emplazado en el centro de la célula, es muy característico por su cromatina irregularmente repartida, pero con tendencia a reunirse o acumularse en la periferia nuclear, dejando casi vacía, con alguno que otro grumo, la región central del núcleo. El citoplasma es abundante y encierra tres apara-

tos que contribuirán a la formación del espermatozoide: el condrioma, el acroblasto y los centrosomas o sus derivados.

El condrioma o aparato mitocondrial, también denominado por los autores alemanes *Nebenkern*, aparece como una masa esférica casi del mismo diámetro que el núcleo y formada por una región central más obscura y otra periférica hialina y delgada, ambas concéntricas (lám. V, fig. *e-g*).

Al acroblasto se le ve como una vesiculita redondeada y hasta de contorno poligonal, de contenido homogéneo (lám. V, figs. *e*, *h*). Los autores lo homologan con el aparato de Golgi, y en otros casos está destinado a suministrar el acrosoma o perforador del espermatozoide maduro. En este caso yo no he podido seguir su evolución hasta el final.

En las espermátidas jóvenes, (lám. V, figura *e*) se distingue ya un filamento finísimo que, arrancando de la superficie nuclear, se dirige radialmente, casi recto, hacia el borde del citoplasma, al que en algunos casos logra traspasar; y como en otras espermátidas más jóvenes aún no se logra discernir tal filamento, su crecimiento, si no es rápido, debe transcurrir al principio con una delgadez extrema. En el punto de arranque del filamento no se logra tampoco distinguir los centrosomas; pero, como luego veremos, deben de existir dos, y quizá su pequeñez y la proximidad al núcleo impiden verlos.

El principio de la espermiohistogénesis se nota porque el citoplasma se hace más ovoideo, dejando al núcleo, que entonces no parece compartir este proceso, en una posición excéntrica. Paralelamente, el condrioma se alarga también, al paso que su región periférica se hace más perceptible, sin dejar de ser hialina (lám. V, figs. *f-g*).

Continuando estos procesos de alargamiento del citoplasma, condrioma y filamento, la espermátida adopta una forma cónica muy alargada, hacia cuya base queda recluído el núcleo (lám. V, fig. *h*). Por estos momentos el núcleo experimenta una absoluta homogeneización de su contenido, tiñéndose intensamente por igual todo él. Los centrosomas empiezan a verse como dos gránulos muy próximos adosados al núcleo, comprobándose que uno de ellos (centrosoma distal) es el que emite el filamento, y el otro (centrosoma proximal) permanece inalterable (lám. V, fig. *h*).

Desde estos momentos el núcleo se alarga también (lám. V, figu-

ras *i-j*) y queda rodeado de una capa de citoplasma más delgada cada vez. Entonces el centrosoma proximal inicia una formación alargada sobre la periferia nuclear, que se dispone y crece en el mismo sentido que el núcleo (lám. V, figs. *j-m*); en la figura *l*, lámina V, puede verse cómo del centrosoma distal arranca el filamento, y del proximal, esta formación supranuclear.

Obsérvese (lám. V, figs. *g*, *i-m*) que el filamento axial de la cola no queda nunca envuelto por el condrioma, sino bordeándolo. Las figuras *o*, lámina V, que representan cortes transversales de la cabeza, correspondientes al estado de las figuras *k-l*, lámina V, muestran que la formación del centrosoma proximal es a modo de un cordón dispuesto sobre la región del núcleo en que está más concentrada la cromatina.

El alargamiento continuo de la cabeza y de la cola del espermatozoide se hace a expensas de un progresivo adelgazamiento de las mismas (lám. V, figs. *k n*), quedando al final (lám. V, fig. *n*) formado el espermatozoide por una cabeza cilíndrica finísima, intensamente tingible por la hematoxilina y el violeta de genciana, y una cola también muy delgada, en la que se distingue el filamento axial, sin que pueda entonces precisarse si éste realmente está incluído, como parece, en la vaina de citoplasma o, como más bien indica su evolución anterior, solamente está adosado a ese resto de citoplasma. La cabeza y la cola son larguísimas y sólo parcialmente se hallan representadas en la figura *m*, lámina V.

El número de cromosomas y su identificación.

(Lám. VII y figs. del texto 1-2).

Hoy día son muchas y de diversa índole, normales [1] y anormales, las excepciones a la constancia numérica de los cromosomas en una misma especie orgánica que restan a esta aserción la importancia que quizá se pensó al principio que tenía, y obligan a considerarla como una *regla;* desde luego, muy general, pues aun quitando las especies orgánicas digaméticas con diferente dotación numérica de cro-

[1] Sin ir más allá, tenemos un ejemplo de esto en el interesante caso de *Blaps* (Nonídez, 1914, 1915, 1920).

mosomas en uno y otro sexo, son muchos los animales y plantas en que esa constancia se verifica absolutamente en ambos sexos, aparte, claro es, de las variaciones universales anejas a las generaciones haploide y diploide.

Este último es el caso en que precisamente se encuentra *Phytodecta variabilis*.

En la lámina VII están dibujadas en perspectiva polar las placas ecuatoriales de cinco espermatogonias en metafase. Una de ellas (lámina VII, fig. *e*), teñida con hematoxilina férrica, puede servir para for-

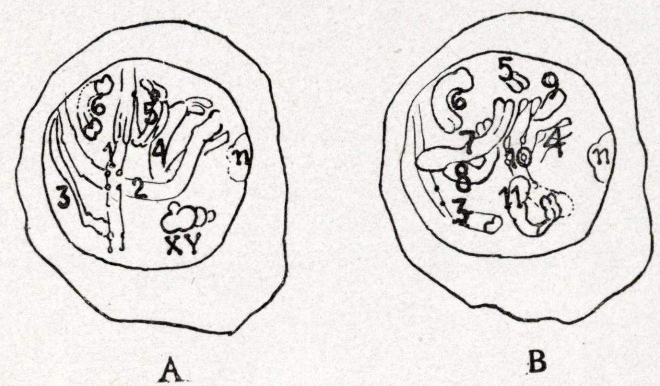


Fig. 1.—Los esquemas A y B de esta figura corresponden, respectivamente, a las figuras *g* y *h* de la lámina IV—que representan dos enfoques sucesivos de un mismo espermatocito—y permiten comprobar al final del período paquitene la presencia de once (números 1 a 11) filamentos paquitenes o *gemini* de autosomas, un cariosoma XY—integrado por ambos heterocromosomas— y un nucléolo.

marse idea de toda la célula en este estado; en las demás (lám. VII, figs. *a-d*), teñidas con violeta de genciana, sólo se ven los cromosomas. En las cinco se cuentan sin dificultad 24 cromosomas. Estas cinco, por este y otros motivos, son las que me pareció más conveniente representar; pero en toda espermatogonia en metafase cuyos cromosomas se distinguiesen claramente, he comprobado este número diploide de 24 cromosomas.

Las figuras *g* y *h* de la lámina IV representan dos enfoques sucesivos del núcleo de un mismo espermatocito al final del período paquitene, cuando el grosor de los cromosomas es mayor y su longitud menor durante la profase de conjugación, condiciones que facilitan el análisis del núcleo en este estado para los fines que perseguimos. Valiéndose de los esquemas respectivos (fig. 1 del texto: A, B) de dichos enfoques, pueden contarse (1 a 11) once filamentos paquitenes—que

constituyen otros tantos *gemini* de autosomas (véase pág. 475)—, un cariosoma XY — que ya hemos interpretado (pág. 481) como otro *geminus* formado por los heterocromosomas—y finalmente el nucléolo *n*. No en muchos, pero sí en varios espermatocitos en este estado, he podido comprobar este mismo resultado: 11 *gemini* de autosomas y 1 *geminus* de los heterocromosomas.

En la metafase de la primera división de maduración (lám. IV, figuras *q*, *r* y esquemas correspondientes, fig. 2 del texto: A, B) se cuen-

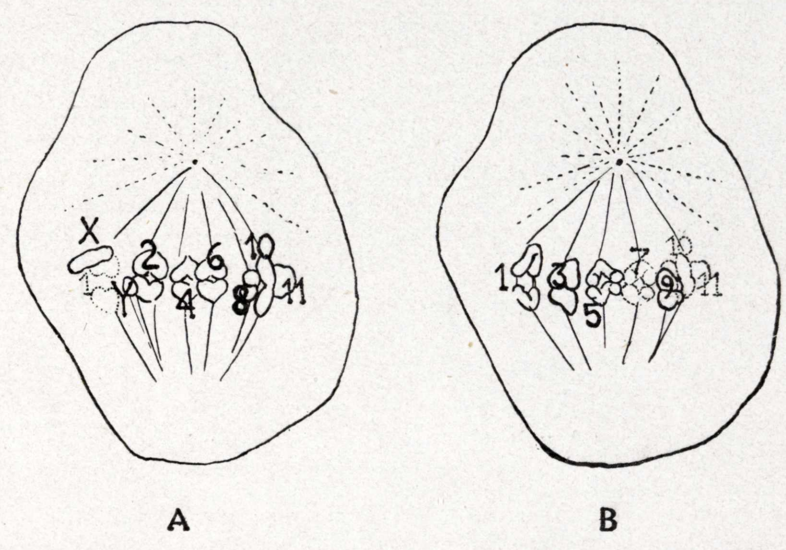


Fig. 2.—Los esquemas A y B de esta figura corresponden, respectivamente, a las figuras *q* y *r* de la lámina IV—que representan dos enfoques sucesivos de un mismo espermatocito—y permiten comprobar en la metafase de la primera división de maduración un heterocromosoma X, otro heterocromosoma Y y once (números 1 a 11) cromosomas dividiéndose, que son los *gemini* formados por los autosomas.

tan también 11 cromosomas bivalentes o *gemini* y un par de heterocromosomas, X e Y.

Y por último, en la metafase de la segunda división de maduración (lám. V, figs. *b*, *c*) se cuentan, en todo caso, 12 diadas.

Todos estos datos en perfecta concordancia nos permiten concluir que en *Phytodecta variabilis* (Ol.) el número diploide de cromosomas es 24, y el número haploide, 12.

*
* *

Pasemos ahora a examinar otra cuestión que la observación de los cromosomas de *Phytodecta* en estos mismos estados nos lleva a tocar.

El principio de que los cromosomas haploides de una misma especie orgánica son diferentes cualitativamente (en composición o en constitución), cuenta con pruebas conseguidas independientemente en campos distintos: genéticas, que son las pruebas todas de la teoría cromosómica de la herencia, demostrando cómo los cromosomas haploides son portadores de genes diferentes en calidad y número para cada uno de aquéllos; y embriogénicas, o procedentes de la mecánica del desarrollo, como lo son las ya clásicas de Boveri, estudiando el desarrollo de los huevos dispérmicos (fecundados por dos espermatozoides y, por tanto, constituyendo zigotos triploides) de erizos de mar, cuyas primeras segmentaciones, tetrapolares, repartían al azar los cromosomas entre los diferentes blastómeros que de este modo originaban, permitiendo entonces el análisis directo de los efectos de aquellos cromosomas.

Pues bien: aquel principio encuentra una confirmación citológica en el hecho de que los cromosomas de las células diploides de muchos animales y plantas sean homologables por pares, de igual manera en los distintos individuos de dicha especie, raza o forma, para un determinado momento del ciclo cromosómico, que es generalmente la metafase; pues, como se ha observado, es entonces cuando la personalidad, valga la palabra, de los cromosomas aparece más acusada y perceptible. Esto nos indica que las mencionadas diferencias específicas o peculiares de la constitución de cada cromosoma haploide pueden traducirse, o mejor, pueden ir acompañadas de otras, también constantes, comprobables citológicamente, que permiten reconocer en esos casos los presuntos representantes (paterno y materno) de cada par de cromosomas; bien entendido, que no es distinguir en éstos uno del otro, al menos en la generalidad de tales casos, sino conjuntamente los dos de cada par.

Cuáles son esas diferencias o qué notas conceptúan como homólogos a dos (o más, en casos de poliploidía) cromosomas desde el punto de vista citológico no es, como se sabe, muy fácil de precisar, aunque tales homologías resulten indudables en cada caso. En general son diferencias de tamaño y forma, iguales para cada dos cromosomas determinados de la dotación diploide; y así han sido hechas las identificaciones de cromosomas por Metz y otros muchos autores en las especies de *Drosophila*, por Nawaschin en las de *Crepis*, por Carothers, Ro-

berston y otros en varios ortópteros (*Circotettix*, *Hesperotettix*, *Trimerotropis*, *Syrbula*, etc.), y otras que sería prolijo enumerar y que también aparecen como ejemplos clásicos en los tratados generales (Wilson, 1925; Bělař, 1928*a*). Sin embargo, no es éste el único criterio que ha de utilizarse para homologar los cromosomas diploides: bien distintos son en forma y tamaño los cromosomas sexuales o heterocromosomas de muchos animales y plantas y, no obstante, se consideran homólogos. Es, en estos casos, su comportamiento durante la reducción cromosómica en lo que se basa la afirmación de su homología; pero nótese, corroborando aquella imprecisión de que hablamos al principio de este párrafo, que si en muchos de tales casos es su conjugación durante la profase, al tiempo de los autosomas, en otros es casi la ausencia de la misma, con brevísimo apareamiento ulterior (después de la primera división de maduración), el hecho de observación citológica de que se han servido los autores para afirmar la homología de tales cromosomas, como ocurre en los conocidísimos casos de *Oncopeltus* y *Lygaeus* estudiados por Wilson (1925). Y si a esto añadimos los casos más infrecuentes de reducción asindética conocidos en infusorios (*Chilodon*), cochinillas (*Pseudococcus nipae*) y en algunos dípteros (*Sciara*), resulta más difícil aún encontrar una definición general, o un carácter citológico general de cromosomas homólogos.

Más raramente se presentan casos en que la homologación de cromosomas está facilitada, y aun decidida, por una tendencia a la aproximación, que se deja notar entre los cromosomas de la misma forma y tamaño en la metafase generalmente de las mitosis somáticas. Los casos más notables son los de distintos dípteros (*Drosophila*, *Spogostylum*, *Calliphora*, *Sarcophaga*, *Anthrax*, etc.) estudiados por Metz principalmente, aunque también se conocen en otros animales (*Amblystoma* [Parmenter], *Tenodera* [Oguma]) y en algunas plantas (*Galtonia* y otras [Strasburger, Müller]), constituyendo, como hace notar Wilson (1925), una prueba en favor de la parasíndesis, pues en la mayoría de estos casos la tendencia de los cromosomas es a disponerse paralelamente próximos los de cada par. Esta manera de pensar vale tanto como decir que son las mismas afinidades que llevan los cromosomas a conjugarse, las que en tales casos se manifiestan durante la mitosis somática y, por tanto, constituyen la nota más decisiva

a que puede aspirarse al homologar los cromosomas de la dotación diploide de una especie.

Recientemente Shiwago (1929) ha observado también la tendencia a reunirse por pares los cromosomas de igual forma y tamaño en las mitosis del amnios de gallinas y pavas domésticas.

Vemos, pues, que si en general y fundamentalmente es la semejanza de tamaño y de forma la nota citológica que permite homologar dos cromosomas, en otros casos particulares son datos de diversa índole los que hacen posible la homologación.

En la identificación de los cromosomas de *Phytodecta* empleamos tanto su semejanza para los autosomas como su disparidad precisamente para los heterocromosomas, y veremos confirmadas estas identificaciones por una tendencia bastante marcada a reunirse o aproximarse los autosomas de la misma forma.

Observemos nuevamente las metafases de la lámina VII, figuras *a-e:*

En seguida se advierte que los cromosomas de *Phytodecta* son muy diferenciables por su tamaño, y aun más por su forma.

En las cinco placas ecuatoriales existe un cromosoma largo, X, que se halla más o menos curvado típicamente, y en el que se distinguen, al menos, tres porciones, según está esquematizado en la figura *f* al pie de la misma lámina VII. Este cromosoma no tiene otro que se le parezca en forma, ni menos en tamaño, en ninguna de las cinco placas [1]. Es indudablemente el heterocromosoma X, cuya presencia ya hemos comprobado en otro momento (véase pág. 481).

En las placas de las figuras *a-d*, letra Y, se ve también un cromosoma de forma que me fué difícil de precisar, pero que por su aspecto globoso puede comprobarse que también carece de semejante. Por tanto, lo identificaremos con el heterocromosoma Y, del que también tenemos ya noticia directa (pág. 481), y cuya presencia es posible, dado el número par diploide de cromosomas que aquí hay, como ya se ha visto.

En las figuras *a-d* saltan a la vista en seguida cuatro cromosomas

[1] El cromosoma I de la figura *a* no puede confundirse con el X de la figura *b*, pues si parecen igualarse en tamaño, es debido a que el primero pertenece a una espermatogonia más grande y el segundo aparece inclinado respecto al plano ecuatorial.

(JJ KK) de la misma forma, por cierto muy característica. Todavía se puede distinguir en ellos dos pares, JJ y KK, en las figuras *a-d*. Obsérvese cómo estos cuatro cromosomas tienden a agruparse siempre, particularmente en las figuras *a* y *d*.

Otro par de cromosomas indudable es el que cuenta con representantes (II) en las figuras *a* y *d*, constituídos por tres porciones, de las cuales la mayor es casi triangular.

Las parejas HH, GG, FF se notan sin dificultad en las figuras *c* y *d*, más difícilmente en la figura *a*, y sólo la última, FF, en la figura *b*; pero véase que en esta última son varios cromosomas los que pudieran pertenecer a las restantes, HH, GG, aunque no se pueda reconocerlas con seguridad.

Los cromosomas del par EE son muy característicos por estar formados de dos porciones, una triangular y la otra redonda, y vense en las figuras *b* y *d*. Nótese a uno de los representantes de este par en la figura *e*, en la región central y hacia el ángulo inferior derecho.

Los largos cromosomas BB, compuestos de dos porciones casi iguales, pero una de extremo redondeado y la otra con él más aguzado, se distinguen fácilmente en las figuras *a-d*.

En las figuras *b* y *d* se distinguen otros dos cromosomas bastante largos, AA, también formados de dos porciones casi iguales y rectas; pero con ambos extremos libres, redondeados. Obsérvese que en esas dos figuras son también reconocibles los cromosomas BB. Un representante del par A se ve también en la figura *c*.

El par DD, formado de dos porciones también iguales y encorvadas simétricamente, se le reconoce en las figuras *b-d*. Adviértase que en las figuras *b* y *c* uno de ellos presenta la misma bolita terminal en una de sus ramas.

Los cromosomas CC, que son los de forma más difícil de precisar, se reconocen en las figuras *b* y *d*.

Todos estos cromosomas esquematizados y dispuestos en fila en la parte inferior de la lámina VII, figura *f*, se reconocen y homologan por pares fácilmente en la figura *d*, excepto el heterocromosoma X, cuyo homólogo no puede ser en esa misma figura otro que Y, el cual, por otra parte, no cabe confundirlo, como pudiera hacerse a primera vista, con alguno de los G, a poco que se repare. Identificaremos, pues, el cromosoma señalado con la letra Y en la figura *d* como el heterocromo-

soma Y. Véase que la forma de este cromosoma, que tan claramente consiguió percibirse en este caso, puede ser muy bien la que, con no tanta claridad, presenta en la figura *b*.

En resumen, cada uno de los cromosomas esquematizados en la figura *f* se reconoce por sus dos representantes en varias de las metafases representadas; todos a la vez, en la metafase de la figura *d*; y las otras formas no identificadas en alguna de las figuras *a-c* no se repiten en las restantes, y son explicables, a mi juicio, aparte de que la orientación del cromosoma respecto al observador no siempre es favorable para formarse una percepción de su forma real, porque los cromosomas no evolucionan sincrónicamente, como puede observarse en las figuras *b-f*, lámina III, hacia el máximum de condensación metafásico, en el cual son más reconocibles.

Por último, contemplando todas las placas de la lámina VII, veremos confirmadas o apoyadas estas homologaciones por la tendencia manifiesta que tienen los cromosomas de la misma forma y de igual tamaño a disponerse lo más próximos posible. Obsérvese particularmente a este respecto la figura *d*, donde casi todos ellos están dispuestos por pares. El caso de los autosomas JJ y KK es muy significativo, pues ambos pares son parecidísimos y en todas las placas están muy próximos.

Consideraciones finales.

Como digo al principiar este trabajo, Zulueta (1925) supuso, para explicar sus experimentos de cruzamiento en *Phytodecta*, que el macho de este crisomélido tendría en sus células un par de heterocromosomas X e Y, y la hembra dos heterocromosomas XX, o, como también suele decirse, que dicha especie pertenece al tipo *Lygaeus*. Con las presentes investigaciones en la espermatogénesis de *Phytodecta* queda, pues, demostrada por observación directa la primera parte de aquella hipótesis: que el macho de *Phytodecta* posee un par de heterocromosomas, que identificamos al mayor como el X y al menor como el Y. Si el estudio aislado de la espermatogénesis nos ha demostrado que *Phytodecta* responde al tipo XY o tipo *Lygaeus*, de ningún modo hubiéramos podido, inversamente, afirmarlo por un estudio de la ovogénesis, pues aun en el caso más favorable (semejanza absoluta de

los dos componentes en todos los pares de cromosomas), nada hubiésemos logrado saber acerca de si ocurría, o no, otro tanto en el macho[1].

Otro hecho comprobado en la espermatogénesis de *Phytodecta* es la conjugación parasindética de sus cromosomas en el primer espermatocito durante el estado leptotene.

Finalmente, el número[2] de sus cromosomas es $n = 12$, y todos ellos son identificables.

Y ahora sólo quiero indicar que la reducción cromosómica de *Phytodecta* por su conjugación parasindética, por sus estados de *bouquet*, por el típico estado estrepsitene, por la pareja de heterocromosomas XY y por la misma forma de los autosomas, realiza la modalidad más frecuente en los animales, pudiendo tomarse su estudio como tipo de la reducción cromosómica en los metazoos.

Zusammenfassung.

Um das Ergebnis seiner Kreuzungsexperimente am Chrysomeliden *Phytodecta variabilis* zu erklären, sprach Prof. Zulueta (1925) die Vermutung aus, dass dieses Insekt dem *Lygaeus*- oder XY-Typs der Heterochromosomen angehört: denn die Vererbung bestimmter Gene ist nur bei der Annahme zu erklären, dass diese in gleicher Weise durch das Chromosom X und das Chromosom Y übertragen werden. Darum schlug Prof. Zulueta mir vor, den zytologischen Beweis für den genannten Typus zu erbringen. Es ist mir eine Freude, ihm an dieser Stelle für seine Anregung meinen Dank auszusprechen.

Die vorliegende Arbeit bringt meine ersten Forschungen über diese spezielle Frage der Spermatogenese der *Phytodecta*, die es mir ermöglicht haben, in Uebereinstimmung mit der Vermutung Zuluetas das Vorhandensein von einem Paar Heterochromosomen im ♂ nachzuweisen und ausserdem die Autosomen in 11 Paaren festzustellen und

[1] Sólo en el caso, *sumamente improbable* tratándose de un coleóptero, de que se hubiera observado en las células de la hembra un par de heterocromosomas desiguales se habría podido afirmar que el insecto pertenecía, por el contrario, al tipo ZW en que se encuentran los lepidópteros y las aves.

[2] Sigo la formulación usada por los botánicos de tomar como número fundamental el haploide.

ihre Homologien zu identifizieren. Ebenso konnte ich eine Parallelkonjugation der Chromosomen und den anormalen Charakter der synaptischen Ballung feststellen.

Bei der letzten Mitose der Spermatogonien kann man in der Interphase einen grossen Nucleolus (Taf. III, Abb. *a)* beobachten, der auch noch während der Prophase anhält. Von ihrem Beginn an erscheinen die Chromosomen der Länge nach gespalten (Taf. III, Abb. *b-e)* und bilden so ein solches Spirema, dass der Kernraum zu einem verhältnismässig grossen Teile von Chromosomen frei ist; in dieses Spireme kann man einigermassen fortgeschrittenen Stadien mit Sicherheit das Vorhandensein von freien Chromosomenenden (Taf. III, Abb. *c)* bestimmen.

Beim Erscheinen des achromatischen Apparates bemerkt man, dass er nur aus den Centrosomen und den Halbspindeln (Spindelpolteile von Bělař, 1928) besteht und dass deswegen die Zentralspindel und die Polstrahlungen (Taf. III, Abb. *e* und *f)* fehlen. In der Metaphase (Taf. III, Abb. *g)* ergibt sich das Gleiche und darüber hinaus noch, dass die Chromosomen, wahrscheinlich wegen des Fehlens der Zentralspindeln zu ganzer Aequatorialplatte angeordnet sind (vgl. auch Taf. VII, Abb. *a-e*). Am Ende der Anaphase (Taf. III, Abb. *h*), tritt aus jeder der beiden Tochterchromosomengruppen auf einem einzigen Meridian ein Chromosom hervor. Diese beide Chromosomen sind viel länger als die übrigen, und sie können deswegen nur die X-Chromosomen (vgl. Taf. VII) sein. Zwischen beiden Tochterchromosomengruppen unterscheidet man die Fasern des Stemmkörpers (Bělař, 1928*a*, 1929), die bei ihrem Durchgang durch die Aequatorialplatte die für den Anfang einer Diastemenbildung charakteristischen Verdickungen zeigen. Diese Diastemenbildung, vervollständigt, zusammen mit der Furchung des Zytoplasmas während der Telophase (Taf. III, Abb. *h-k*) die Zellteilung, welche ihrerseits die erste Spermatozyte hervorbringt.

Am Anfang der Konjugationsphase sieht man, wie aus dem Kern der Spermatozyten die Leptotänchromosomen hervorkommen, die eine eigentümliche polare Orientierung annehmen und so die Bukettstadien einleiten (Taf. IV, Abb. *a-d*). Unmittelbar danach suchen sich je zwei dieser Leptotänchromosomen und vereinigen sich paarweise der Länge nach (Taf. IV, Abb. *c-d*) d. h., dass bei den *Phytodecta* auf

direktem Wege eine Parallelkonjugation festzustellen ist. Während der darauffolgenden Pachytänperiode findet in den Chromosomen eine fortschreitende Verkürzung, Verdickung und Auflockerung statt, wo durch zwei symmetrische Reihen von Chromomeren entstehen, die die Doppelnatur der Pachytänchromosomen (Taf. IV, Abb. *e-h*), zeigen. In meinen Präparaten erscheinen während der Chromosomenkonjugation und auch nachher während des ganzen Pachytänstadiums Spermatozyten, die nicht das leiseste Anzeichen einer Verklumpung in ihren Chromosomen besitzen und noch andere, die genau im selben Stadium eine ausgesprochene synaptische Ballung aufweisen. So kann sich ausser der Serie, die in den Abbildungen *e-h*, Tafel III, dargestellt ist, eine zweite bilden, die den Abbildungen *a-d*, Tafel VI, entspricht. Ausserdem beobachtet man die Synapsis niemals beim Beginn des Färblichkeitsverlustes der Chromosomen, der den Uebergang zur postsyndetischen Interphase bildet. Die synaptische Ballung ist hier also abnormer Verlauf oder Artefakt.

Nach dem Pachytänstadium erfahren die Chromosomen eine fortschreitende Auflockerung, die den Kern der Spermatozyten zu einer ausgesprochenen postsyndetischen Interphase (Taf. IV, Abb. *j-l*) bringt, in der nur der Nucleolus und das Geschlechtschromosom, die während der ganzen Konjugationsphase (Taf. IV, Abb. *a-l* und Taf. VI) zu beobachten sind, unveränderlich bleiben. In der Folge tritt ein regelrechtes Strepsitänstadium (Taf. IV, Abb. *m-o*) ein, das auf die Diakinese (Taf. IV, Abb. *p*) hinausläuft. Bei der ersten Reifungsteilung (Taf. IV, Abb. *q-r* und Textabb. 2) stellt man das Vorhandensein eines Paares von Geschlechtschromosomen X und Y fest, die sich etwas früher als die Autosomen trennen, deren Mehrzahl, durch die Vorgänge im Strepsitänstadium bedingt, für den Uebergang zur Diakinese, nunmehr die Reduktionsteilung ausführen müssen. In der Anaphase der ersten Reifungsteilung (Taf. IV, Abb. *s*) tritt die Doppelnatur der Dyaden hervor.

Bei der Interkinese (Taf. V, Abb. *a*) bleiben die Dyaden in verdichtetem Zustand und gehen so unmittelbar dazu über, die Aequatorialplatte der zweiten Reifungsteilung (Taf. V, Abb. *b d*) zu bilden.

Die Spermiohistogenese verläuft normal (Taf. V, Abb. *e-o*), wobei nur das Vorhandensein von Centrosomenderivaten auf Kosten des proximalen Centrosoms am Kopfe des Spermiums (Taf. V, Abb. *j-m*

und *o*) erwähnenswert ist, ferner auch die Tatsache, dass die Hauptfaser wahrscheinlich, wie ihr Formationsprozess (Taf. V, Abb. *g* und *i-m*) zeigt, den zytoplasmatischen Ueberzug des Schwanzfadens umrahmen, aber ohne in seine Mitte eingeschlossen zu sein.

Bei den Abbildungen *a-e* der Tafel VII, die Aequatorialplatten der Spermatogonienteilung darstellen, zählt man 24 Chromosomen. In den Abbildungen *g* und *h* der Tafel IV, die zwei aufeinanderfolgende Einstellungen derselben Spermatozyte darstellen und zwar durch ihre entsprechenden Schemata (Textabb. 1, *A* und *B*), zählt man 11 Pachytänfäden oder *Gemini* von Autosomen, der *Geminus* XY ist durch zwei Geschlechtschromosomen gebildet; *n* zeigt den Nucleolus. Ebenso zählt man bei den Abbildungen *q* und *r* der Tafel IV und den entsprechenden Schemata (Textabb. 2, *A* und *B*), welche die zwei Einstellungen ein und derselben Spermatozyte in der Metaphase der ersten Reifungsteilung darstellen, 11 Doppelchromosomen, die von Autosomen gebildet sind. Man sieht auch die zwei Geschlechtschromosomen X und Y. Bei der Metaphase der zweiten Reifungsteilung (Taf. V, Abb. *b* und *c*) zählt man in jedem Falle 12 Dyaden. Deswegen ist bei der *Phytodecta variabilis* (Olivier) die Diploidzahl der Chromosomen 24 und die Haploidzahl der Chromosomen 12. Ausserdem kann man auf den Aequatorialplatten der Spermatogonienteilungen (Taf. VII, Abb. *a-e*) die Geschlechtschromosomen X und Y identifizieren und die übrigen Chromosomen in 11 Paaren homologer Autosomen, wie es das Schema (Taf. VII, Abb. *f*) zeigt, feststellen. Man beachte, wie die homologen Autosomen sich parallel der Länge nach aneinander legen.

Zusammenfassend ist bei der *Phytodecta variabilis* (Ol.) die Parallelkonjugation der Autosomen, das Vorhandensein der Geschlechtschromosomen und die Zahl der Chromosomen $n = 12$ nachgewiesen. Die Autosomen lassen sich identifizieren.

Soviel mir bekannt, ist mit Ausnahme des Falles der *Drosophila*, bei der man das Vorhandensein des Geschlechtschromosoms Y noch vor der Vererbung von Faktoren, die durch dieses Chromosom hervorgerufen werden, kannte, unter allen Fällen von Vererbung durch Y-Chromosom, die bei Tieren angeführt werden, dieser der *Phytodecta* der erste, bei dem man zytologisch das Vorhandensein des Chromosoms Y beweisen kann.

Trabajos citados.

AIDA, T.

1921. On the inheritance of color in a fresh-water fish, *Aplocheilus latipes* Temmick and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. (*Genetics*, vol. VI.)

BĚLAŘ, K.

1925. Der Chromosomenbestand der *Melandrium*-Zwitter. (*Zeitschr. f. ind. Abst.- u. Vererbungslehre*, vol. XXXIX, pág. 184.)

1928, *a*. Die cytologischen Grundlagen der Vererbung. (In: *Handbuch der Vererbungswissenschaft*, vol. I, Berlín.)

1928, *b*. Über die Naturtreue des fixierten Präparats. (*Verh. des V. Int. Kongr. f. Vererb.*, vol. I, Berlín.)

1929. Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. II. Untersuchungen an den Spermatocyten von *Chorthippus (Stenobothrus) lineatus* Panz. (*Arch. f. Entw.-Mech.*, vol. CXVIII.)

BLACBURN, K. B.

1923. Sex chromosomes in plants. (*Nature*, vol. CXII.)

BORDÁS, M.

1912. Contribution à l'étude de la spermatogénèse chez la *Sagitta bipunctata* Quoy et Gaim. (*La Cellule*, vol. XXVII.)

1914. Doctrinas actuales sobre la reducción numérica de los cromosomas y su aplicación a la espermatogénesis de la *Sagitta bipunctata*. (*Mem. de la R. Soc. Esp. de Hist. Nat.*, vol. X.)

1920. Estudio de la ovogénesis en la *Sagitta bipunctata* Quoy et Gaim. (*Trab. del Mus. Nac. de Cienc. Nat.*, serie zool., núm. 42.)

1921. La profase de reducción en la ovogénesis de *Dendrocoeleum lacteum* Oerst. (*Trab. del Mus. Nac. de Cienc. Nat.*, serie zool., núm. 44.)

1922. El problema de la reducción cromática en la espermatogénesis de *Dendrocoeleum lacteum* Oerst. (*Libro en honor de D. Santiago Ramón y Cajal*, vol. II. Madrid.)

BRESLAWETZ, L.

1929. Zytologische Studien über *Melandrium album*. (*Planta*, vol. VII.)

CAROTHERS, E. E.

1926. The maturation divisions in relation to the segregation of homologous chromosomes. (*The Quart. Rev. of Biol.*, vol. I.)

CAULLERY, M.

1928-29. *L'Année Biologique*, 2.ª part., págs. 221-222.

CHIKERING, A. M.

1927. Spermatogenesis in the Belostomatidae. II. The chromosomes and cytoplasmic inclusions in the male germ-cells of *Belostoma flumineum* Say, *Lethocerus americanus* Leidy and *Benacus griseus* Say. (*Jour. of Morphol.*, vol. XLIV.)

DEMEREC, M.

1927. A possible explanation for Winge's findings in *Lebistes reticulatus*. (*The Amer. Natur.*, vol. LXII.)

GELEI, J.

1921. Weitere Studien über die Oogenese des *Dendrocoeleum lacteum*. II. Die Längskonjugation der Chromosomen. (*Arch. f. Zellforsch.*, vol XVI.)

GOLDSCHMIDT, R., et KATSUKI, K.

1928. Cytologie des erblichen Gynandromorphismus von *Bombyx mori*. (*Biol. Zentralbl.*, vol. XLVIII.)

HEITZ, E.

1925. Beitrag zur Cytologie von *Melandrium*. (*Planta. Archiv. f. wiss. Bot.*, vol. I.)

LENOIR, M.

1927. Observation vitale de cinèses polliniques dans le *Lilium candidum* L. (*C. R. de la Ac. de Sc.*, vol. CLXXXIV.)

MCCLUNG, C. E.

1928. Differential chromosomes of *Mecostethus gracilis*. (*Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, vol. VII.)

NONÍDEZ, J. F.

1914. Los cromosomas en la espermatogénesis del *Blaps lusitanica* Herbst. (*Trab. del Mus. Nac. de Cienc. Nat.*, serie zool., núm. 18.)

1915. Estudios sobre las células sexuales. I. Los cromosomas goniales y la mitosis de maduración en *Blaps lusitanica* y *B. Waltli*. (*Mem. de la R. Soc. Esp. de Hist. Nat.*, vol. x.)

1920. The meiotic phenomena in the spermatogenesis of *Blaps*, with special reference to the X-complex. (*Jour. of Morph.*, vol. XXXIV.)

ORUETA, D. DE

1923. Microscopía. (Madrid).

PÉTERFI, T.

1928. Methodik der wissenschaftlichen Biologie. (Berlín).

ROMEIS, B.

1928. Guía-formulario de Técnica histológica. (Barcelona).

SCHMIDT, J.

1920. Racial investigations. IV. The genetic behavior of a secondary sexual character. *(C. R. des Trav. du Labor. Carlsberg.*, vol. XIV, núm. 8).

SCHITZ, V.

1925. Études sur l'évolution des éléments genitaux chez Mollusques Pteropodes. I. La spermatogénèse. *(Biologia Generalis*, vol. I).

SHIWAGO, P. J.

1929. Sur les garnitures chromosomiales des Poules et des Dindes. *(C. R. de la Ac. de Sc.*, vol. CLXXXVIII).

STERN, C.

1927. Ein genetischer und zytologischer Beweis für Vererbung im Y-Chromosom von *Drosophila melanogaster*. *(Zeitschr. f. ind. Abst-. u. Vererbungslehre*, vol. XLIV).

STEVENS, N. M.

1909. Further studies on the chromosomes of the coleoptera. *(Jour. of Exper. Zool.*, vol. VI. Philadelphia).

VAUPEL, J.

1929. The spermatogenesis of *Lebistes reticulatus*. *(Jour. of Morph.*, volumen XLVII).

WENRICH, D. H.

1916. The spermatogenesis of *Phrynotettix magnus* with special reference to synapsis and the individuality of the chromosomes. *(Bull. of the Mus. of Comp. Zool., Harvard College, Cambridge* [U. S. A.], vol. LX.).

WILSON, E. B.

1925. *The Cell in Development and Heredity*. (New York).

WINGE, Ö.

1922, *a*. One-sided masculine and sex-linked inheritance in *Lebistes reticulatus*. (*C. R. des Trav. du Labor. Carlsberg*, vol. XIV, núm. 18; *Jour. of Genetics*, vol. XII.)

1922, *b*. A peculiar mode of inheritance and its cytological explanation. (*C. R. des Trav. du Labor. Carlsberg*, vol. XIV, núm. 17; *Jour. of Genetics*, vol. XII.)

1923. Crossing-over between the X- and the Y-chromosome in *Lebistes*. (*Jour. of Genetics*, vol. XIII.)

1927. The location of eighteen genes in *Lebistes reticulatus*. (*Jour. of Genetics*, vol. XIV.)

1927. On a Y-linked Gene in *Melandrium*. (*Hereditas*, vol. IX.)

ZULUETA, A. DE

1925. La herencia ligada al sexo en el coleóptero *Phytodecta variabilis*. (Ol.). (*Eos*, vol. I.)

Laboratorio de Biología
del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

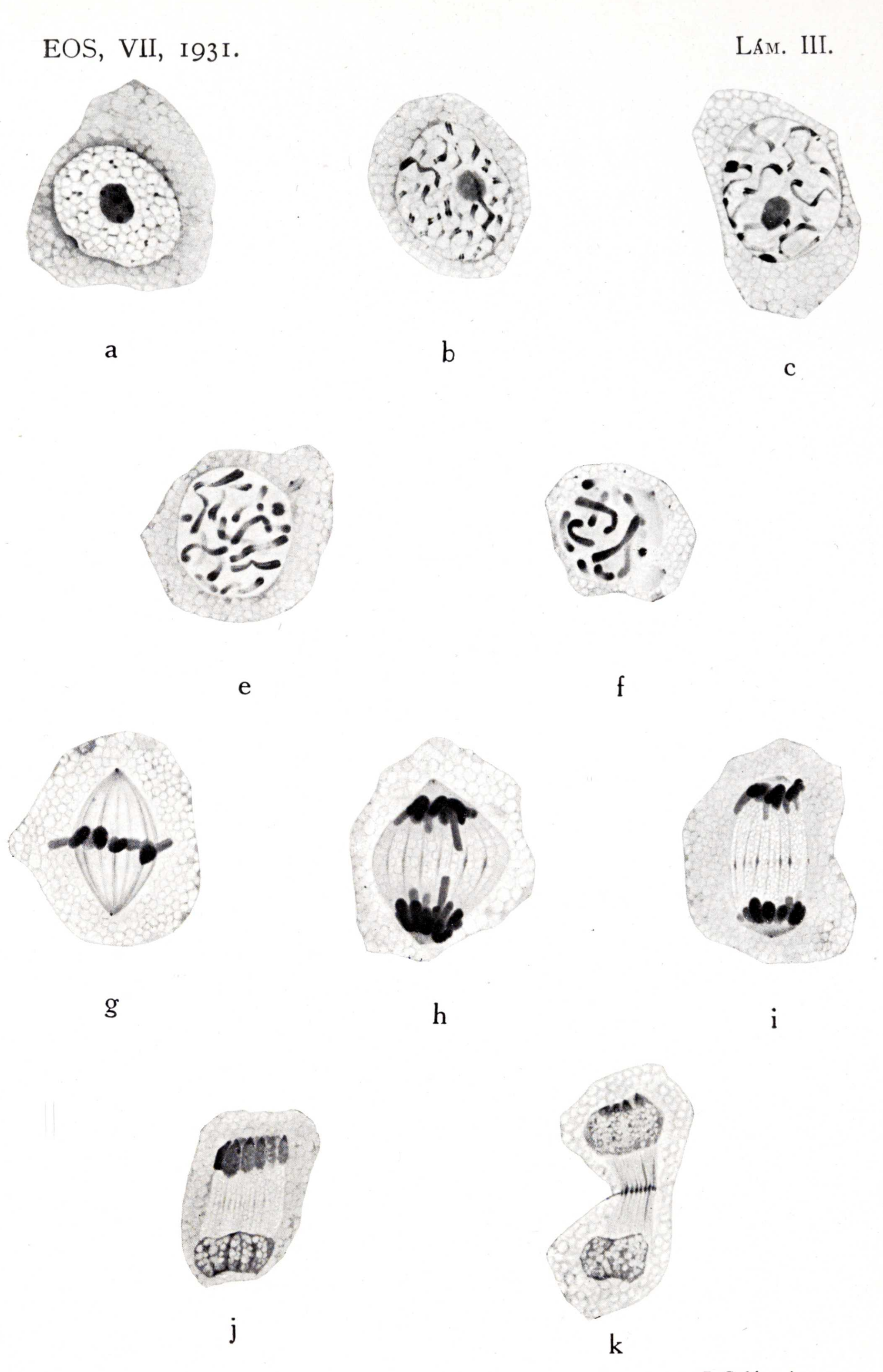
Lámina III. — **La mitosis gonial de** *Phytodecta variabilis* **(Ol.).**

División nuclear y celular de la última generación de espermatogonias.

(Sin huso central, sin ásteres y con centrosomas.)

a, interfase; véase el nucléolo. **b-c,** principio de la profase; los cromosomas, hendidos longitudinalmente ya desde los primeros momentos, se forman dejando amplios espacios de carioplasma libres; es una de las principales características de esta mitosis. **e,** final de la profase; aparece el aparato acromático compuesto de dos centrosomas y sendos husos polares, pero sin huso central. **f,** paso a la metafase; desaparición de la membrana nuclear; compruébese en esta figura lo que en la **e** se dice respecto al aparato acromático; el cromosoma que aparece en primer término hacia el centro de la región nuclear es el autosoma B (véase lám. VII). **g,** metafase; adviértase la ausencia de las radiaciones polares o ásteres y la presencia de los centrosomas; las fibrillas del huso acromático que aquí se ven son las que van del centrosoma a los cromosomas y que constituyen lo que denominan *half spindle* los autores ingleses y americanos, y *Halbspindeln* los alemanes, y que siguiendo a Bělař, preferimos llamar husos polares. **h,** anafase; los cromosomas largos que sobresalen en ambos grupos de cromosomas hijos son los respectivos heterocromosomas X; obsérvese cómo el cuerpo propulsor (Stemmkörper) alcanza al final de la anafase su mayor desarrollo y cómo en este caso sus fibrillas presentan engrosamientos diastemáticos a su paso por el plano ecuatorial. **i-k,** telefase; hay indicios de procromosomas en **j;** el cuerpo propulsor inicia su regresión en **i.**

a-f, febrero, estufa 19°-23°, Nawaschin; **g-k,** junio, del campo, Flemming-Meves. Hematoxilina férrica. Cortes en parafina de 7 μ. Obj. apocr. n.A. 1,4; 3 mm. Zeiss y ocul. comp. 18 Zeiss. × 2.260.



F. Galán, pinx.

F. GALÁN: Estudios sobre la espermatogénesis de *Phytodecta variabilis* (Ol.)

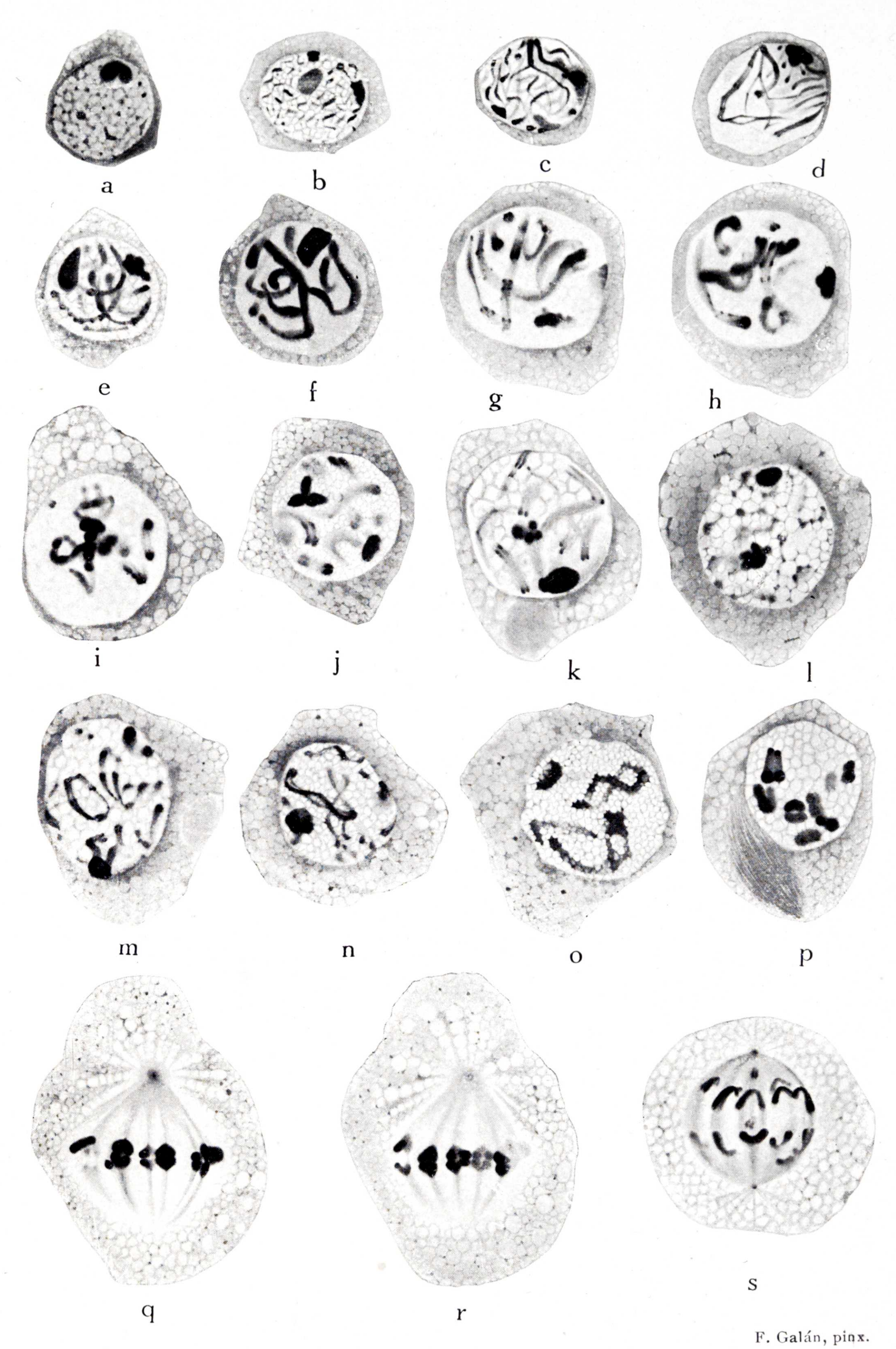
Lámina IV.—**La profase de conjugación y la primera división de maduración en *Pyhtodecta variabilis* (Ol.).**

(Conjugación parasindética con estados de bouquet, *interfase postsindética y estado estrepsitene).*

(Primera división de maduración reductora para los heterocromosomas XY *y para varios autosomas. Sin huso central, con centrosomas y con radiaciones polares.)*

a, interfase presindética del primer espermatocito. **b,** principio de la profase de conjugación; se nota una polarización de las direcciones de los filamentos hacia un punto de la periferia nuclear, que en la figura ocupa el polo superior; véase también el nucléolo, más claro, y el cariosoma, integrado por los cromosomas sexuales, fuertemente teñido. **c-d,** estado leptotene y conjugación paralela de los cromosomas; se ve en **d** el cariosoma. **e-f,** estado paquitene; el nucléolo se ve en ambas y el cariosoma en **e. g, h,** dos enfoques sucesivos e inmediatos de un mismo espermatocito al final del período paquitene; en el primero se ve el cariosoma o heterocromosomas, y en el segundo, el nucléolo; en ambos se nota la rigurosa simetría de lugar y forma de las dos series de gránulos de cada filamento paquitene. **i,** enfoque polar superficial del *bouquet* paquitene. **j,** principio del período diplotene *sensu lato* y del proceso que conduce a la interfase postsindética; nótese la pérdida de colorabilidad de los autosomas y la inalterabilidad del nucléolo y del cariosoma. **k,** estado diplotene y paso a la interfase postsindética. **l,** interfase postsindética; véase el nucléolo arriba y el cariosoma más abajo. **m-o,** estado estrepsitene; en **m** se ve también la fisura ecuacional de cada conjugado, y en el *geminus* en 8 de la figura **o** se evidencia la torsión de los cromosomas. **p,** diaquinesis. **q, r,** dos enfoques sucesivos e inmediatos de un mismo espermatocito en la metafase de la primera división de maduración; en el primero, aparece a la izquierda un heterocromosoma largo X, que marcha hacia arriba, y otro pequeñito, casi esférico, Y, que emigra hacia abajo; en ambos enfoques se ve que muchos *gemini* de autosomas se dividen ahora reductoramente; obsérvese también la disposición en hacecillos de las fibras polares del huso acromático, la ausencia de huso central y la presencia de centrosomas y ásteres, que, como se ve en estas figuras, no son sino debidos a una ordenación radial de las vacuolas y otros elementos de citoplasma. **s,** anafase de la primera división de maduración; las mitades separadas muestran ya su doble constitución como verdaderas diadas que son.

a, d, g-o, mayo, del campo, prefijación vapores OsO_4 y Flemming-Meves; **p,** junio, del campo, Flemming; **b, c, q, r,** febrero, estufa 19°-23°, Nawaschin. Hematoxilina férrica. Obj. apocr. n.A. 1,4; 3 mm. Zeiss y ocul. comp. 18 Zeiss. × 2.260.



F. Galán, pinx.

F. GALÁN: Estudios sobre la espermatogénesis de *Phytodecta variabilis* (Ol.)

Lámina V.—**La segunda división de maduración y la espermiohistogénesis de** *Phytodecta variabilis* **(Ol.).**

(*Interquinesis breve. Segunda división de maduración ecuacional para los heterocromosomas y muchos autosomas, sin huso central, con centrosomas y sin ásteres).*

(*Espermiohistogénesis normal, con formaciones centrosómicas en la cabeza del espermatozoide.)*

a, interquinesis; el núcleo del segundo espermatocito no llega a adoptar un verdadero estado interfásico, las diadas permanecen condensadas, conservando su hendidura; el cromosoma grande al NE del núcleo es probablemente el heterocromosoma X, y al centro se ve un nucléolo. **b-c,** vistas polares de dos placas ecuatoriales de la segunda división de maduración; las diadas acentúan su disociación; en la primera se destaca una, manifiestamente mayor que las demás, y que falta en las segunda, puesto que en ambas se cuentan doce; esa diada corresponde muy probablemente al heterocromosoma X, que en consecuencia a lo que hemos visto, debe de ir sólo en la mitad de los segundos espermatocitos; véase en estas figuras que no hay huso central. **d,** vista meridiana de la metafase de la segunda división de maduración; todas las diadas muestran sus componentes cruzados; existen centrosomas, pero no radiaciones polares. **e,** espermátida; debajo y a la izquierda se ve el condrioma, a la derecha el acroblasto y entre ambos el filamento centrosómico, que dará la cola del espermatozoide. **f-i,** alargamiento del citoplasma, del condrioma y del filamento y homogeneización del núcleo. **j-n,** el núcleo participa también en este alargamiento formando la cabeza del espermatozoide; en **l** se ve cómo el filamento que corre a lo largo de la cabeza del espermatozoide es una derivación del centrosoma proximal, y el filamento de la cola, del centrosoma distal. **o,** enfoques transversales de la cabeza del espermatozoide en los estados **k-l;** véase cómo el filamento centrosómico de la cabeza está adosado a su superficie externa en la región donde la cromatina aparece más condensada. En **g, i-m** se comprueba que el filamento, en otros casos axial, no se halla incluído en el medio del citoplasma y del condrioma de la cola, sino en el borde de estas formaciones; de aquí que en el espermatozoide maduro **m,** aunque no se pueda comprobar directamente, sea probable que, tambien ocurra lo mismo. En las figuras **h-m** no está representada toda la cola, y en la **m** ni toda la cola ni toda **la** cabeza, que entonces son larguísimas.

a, enero, estufa 19°-23°, Nawaschin; **b-o,** junio, del campo, Flemming. Hematoxilina férrica. Cortes en parafina de 7 μ. Obj. apocr. n.A. 1,4; 3 mm. Zeiss y ocul. comp. 18 Zeiss × 2.260.

a b c d

e f g h

i j k l m n o

F. Galán, pinx.

F. GALÁN: Estudios sobre la espermatogénesis de *Phytodecta variabilis* (Ol.)

Lámina VI. — **La contracción sináptica, sinapsis o sinicesis en *Phytodecta variabilis* (Ol.).**

El nucléolo y los heterocromosomas.

a-d, distintos y sucesivos momentos del primer espermatocito durante el período paquitene, mostrando todos una típica contracción sináptica. Compárese esta serie con la que forman las figuras **e-h** de la lámina IV y se verá que ambas se refieren al mismo período, siendo perfectamente correlativas sus figuras; sin embargo, en la de esta lámina aparece una contracción sináptica que falta en la de la lámina IV. El proceso normal está, pues, exento de sinapsis, que debemos interpretar como un artefacto. **e-h,** núcleos del segundo espermatocito en estado paquitene mostrando la diferente colorabilidad del nucléolo, figura **e,** y del cariosoma, figuras **f, g, h,** para el violeta de genciana. En la figura **e** el nucléolo presenta el mismo aspecto piriforme que en la figura **e,** lámina IV. En la figura **h** se observa la estructura escalariforme de algunos *gemini* y la simetría de lugar y forma de ambas series de cromómeros.

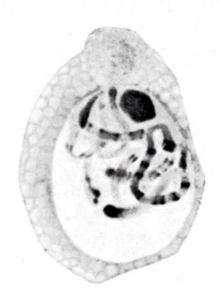
a-c, junio, del campo, Flemming, hematoxilina férrica; **d,** mayo, del campo, prefijación vapores OsO_4 y Flemmig-Meves, hematoxilina férrica; **e-h,** enero, estufa 19°-23°, Nawaschin, violeta de genciana según Gram. Cortes en parafina de 7 μ. Obj. apocr. n.A. 1,4; 3 mm. Zeiss y ocul. comp. 18 Zeiss. **a-d,** × 2.260; **e-h,** × 4.500.



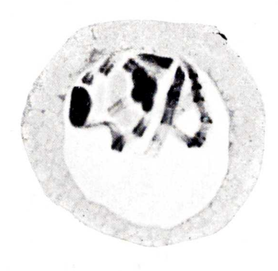
a



b



c



d



e



f



g



h

F. Galán, pinx.

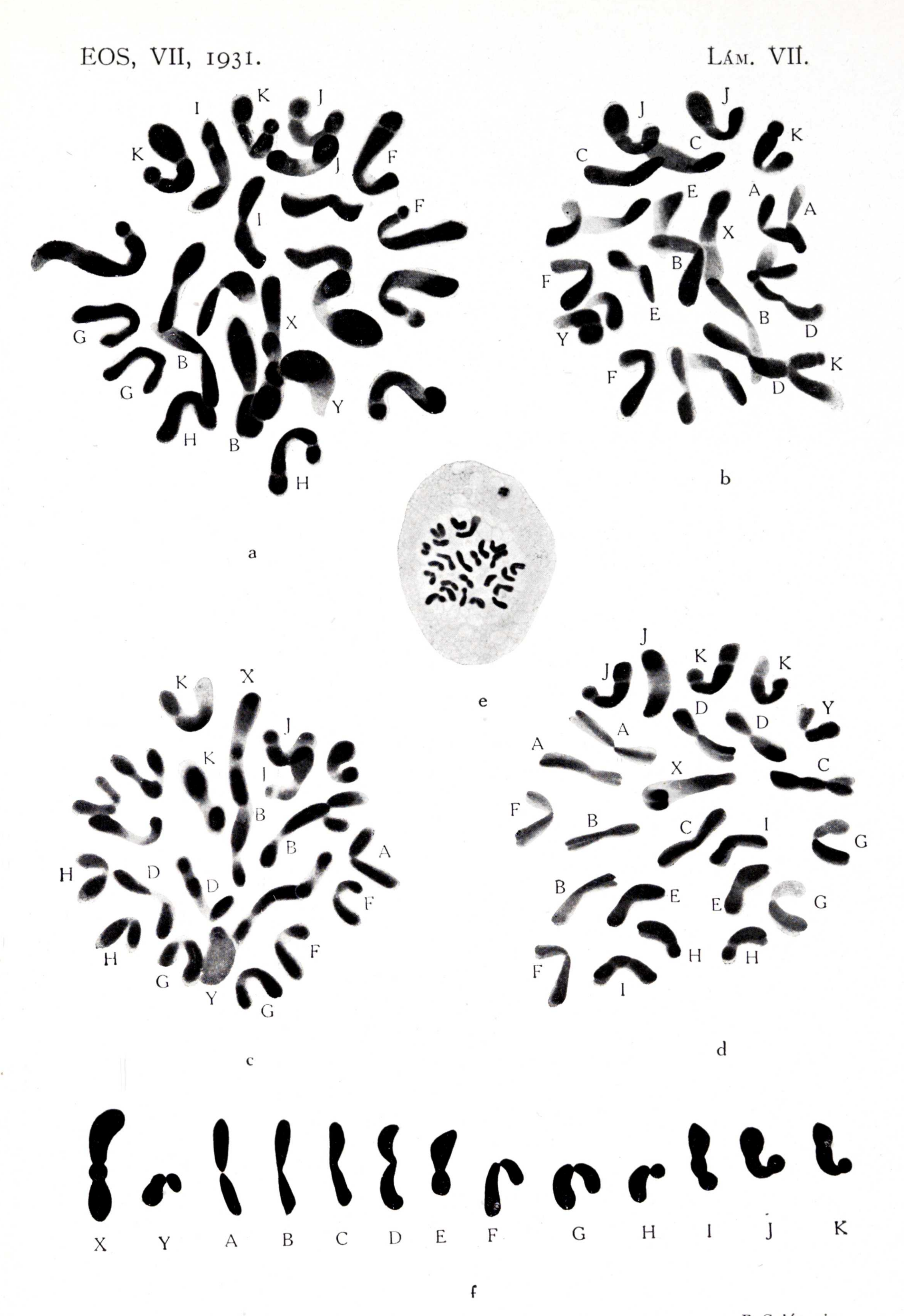
F. GALÁN: Estudios sobre la espermatogénesis de *Phytodecta variabilis* (Ol.)

Lámina VII.—**Los cromosomas goniales metafásicos de** ***Phytodecta variabilis*** **(Ol.).**

(n = *12; un par de heterocromosomas X e Y, según el tipo de* Lygaeus).

Con el esquema de la figura **f** compruébese en las placas ecuatoriales **a, b, c** un largo heterocromosoma X, otro mucho más pequeño Y y once pares de autosomas, identificables cada uno de ellos en varias placas a la vez. Véase también en las placas **a-d** cómo los cromosomas de la misma forma tienden a situarse próximos y paralelos.

a-d, enero, estufa 19°-23°, Nawaschin, violeta de genciana según Gram; **e,** febrero, estufa 19°-23°, Nawaschin, hematoxilina férrica. Cortes en parafina de 7 μ. Obj. apocr. n.A. 1,4; 3 mm. Zeiss y ocul. comp. 18 Zeiss. **a-d,** × 7.500; **e,** × 1.700.



F. Galán, pinx.

F. GALÁN: Estudios sobre la espermatogénesis de *Phytodecta variabilis* (Ol.)